(Translation)

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application:	October 11, 2002
Application Number:	Japanese Patent Application No. 2002-299429
Applicant(s):	RIKEN

July 10, 2003

Commissioner,
Patent Office
(seal)

Shinichiro OTA

Certificate No. 2003-3056559

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application:	２００２年１０月１１日
出願番号 Application Number:	特願２００２－２９９４２９
[ST. 10/C] :	［ＪＰ２００２－２９９４２９］
出願人 Applicant(s):	理化学研究所

２００３年　７月１０日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office　　太田信一郎

出証番号　出証特２００３－３０５６５５９

【書類名】　特許願

【整理番号】　RJH14-130N

【提出日】　平成14年10月11日

【あて先】　特許庁長官　殿

【国際特許分類】　C07K 14/47

【発明の名称】　新規ＩＰ３受容体結合タンパク質とＩＰ３指示薬

【請求項の数】　27

【発明者】

　【住所又は居所】　埼玉県和光市広沢２番１号　理化学研究所内

　【氏名】　御子柴　克彦

【発明者】

　【住所又は居所】　埼玉県和光市広沢２番１号　理化学研究所内

　【氏名】　安東　英明

【発明者】

　【住所又は居所】　埼玉県和光市広沢２番１号　理化学研究所内

　【氏名】　水谷　顕洋

【発明者】

　【住所又は居所】　東京都目黒区目黒本町５－３０－４－２０３

　【氏名】　松浦　徹

【特許出願人】

　【識別番号】　000006792

　【氏名又は名称】　理化学研究所

【代理人】

　【識別番号】　100091096

　【弁理士】

　【氏名又は名称】　平木　祐輔

【選任した代理人】
　　【識別番号】　100118773
　　【弁理士】
　　【氏名又は名称】　藤田　節

【選任した代理人】
　　【識別番号】　100096183
　　【弁理士】
　　【氏名又は名称】　石井　貞次

【手数料の表示】
　　【予納台帳番号】　015244
　　【納付金額】　21,000円

【提出物件の目録】
　　【物件名】　明細書　1
　　【物件名】　図面　1
　　【物件名】　要約書　1
　　【包括委任状番号】　9503608

【プルーフの要否】　要

【書類名】　明細書

【発明の名称】　新規IP_3受容体結合タンパク質とIP_3指示薬

【特許請求の範囲】

【請求項１】　以下の(a)、(b)または(c)のタンパク質。

(a)　配列番号１に示すアミノ酸配列を含むタンパク質(IRBIT)

(b)　配列番号１に示すアミノ酸配列の1～104番目までのアミノ酸配列を含むタンパク質

(c)　配列番号１に示すアミノ酸配列またはその１～104番目までのアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつIP_3受容体に結合するタンパク質

【請求項２】　請求項１記載のタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項３】　以下の(a)、(b)または(c)のDNAからなる遺伝子。

(a)　配列番号２に示す塩基配列を含むDNA

(b)　配列番号２に示す塩基配列の1～312番目までの塩基配列を含むDNA

(c)　(a)または(b)の塩基配列からなるDNAに相補的なDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつIP_3受容体に結合するタンパク質をコードするDNA

【請求項４】　請求項２または３記載の遺伝子を含むベクター。

【請求項５】　請求項２または３記載の遺伝子に、プロモーターが機能し得る形で連結されている、請求項４記載のベクター。

【請求項６】　請求項２または３記載の遺伝子を、蛍光または発光タンパク質をコードする遺伝子とインフレームで連結された形で含む、請求項５記載のベクター。

【請求項７】　蛍光タンパク質が緑色蛍光タンパク質(GFP)、シアン蛍光タンパク質(CFP)、黄色蛍光タンパク質(YFP)、VenusおよびFlAsHならびにこれらの誘導体からなる群から選択される、請求項６記載のベクター。

【請求項８】　請求項４～７のいずれか1項記載のベクターを含有する宿主細胞。

【請求項９】　哺乳動物細胞である、請求項８記載の宿主細胞。

【請求項１０】　サンプル中のIP$_3$を検出するための、請求項１記載のタンパク質を含むIP$_3$指示薬。

【請求項１１】　上記タンパク質が蛍光または発光タンパク質と融合されている、請求項１０記載のIP$_3$指示薬。

【請求項１２】　上記タンパク質がFRET法が可能な２つの蛍光分子からなる組合わせのうちのいずれか一方の蛍光分子で標識されており、上記組合せのうちの他方の蛍光分子で標識されたIP$_3$受容体の少なくともIP$_3$結合ドメインを含有するタンパク質と組合わせてFRET法によりIP$_3$を検出するための、請求項１１記載のIP$_3$指示薬。

【請求項１３】　２つの蛍光分子からなる組合わせが、VenusとCFPとの組合せ、YFPとCFPとの組合せ、またはFlAsHとCFPとの組合せである、請求項１２記載のIP$_3$指示薬。

【請求項１４】　請求項１記載のタンパク質を特異的に認識する抗体またはその機能的フラグメント。

【請求項１５】　ウサギポリクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項１４記載の抗体およびその機能的フラグメント。

【請求項１６】　サンプル中のIP$_3$濃度を測定するための方法であって、

（i）　IRBITまたはそのIP$_3$受容体結合ドメインを含むタンパク質とIP$_3$受容体の少なくともIP$_3$結合ドメインを含有するタンパク質からなるタンパク質複合体を調製し；

（ii）　上記タンパク質複合体とサンプルを接触させ；

（iii）　遊離IRBITもしくはそのIP$_3$受容体結合ドメインを含むタンパク質および/または上記複合体を定量すること；

を含む、上記方法。

【請求項１７】　上記(iii)における定量が、抗IRBIT抗体および/または抗IP$_3$受容体抗体を用いた免疫化学的反応系を利用して実施されることを特徴とする、請求項１６記載の方法。

【請求項１８】　上記(iii)における定量が、IRBITもしくはそのIP$_3$受容体結合ドメインを含むタンパク質またはIP$_3$受容体の少なくともIP$_3$結合ドメインを

含有するタンパク質を予め標識しておいて、該標識物に由来するシグナルを測定することにより実施されることを特徴とする、請求項１６または１７記載の方法。

【請求項１９】　標識が蛍光標識である、請求項１８記載の方法。

【請求項２０】　上記(iii)における定量が、FRET法により実施されることを特徴とする、請求項１６記載の方法。

【請求項２１】　YFPもしくはVenusで標識したIRBITまたはそのIP_3受容体結合ドメインを含むタンパク質と、CFPで標識したIP_3受容体の少なくともIP_3結合ドメインを含有するタンパク質とを用いることを特徴とする、請求項２０記載の方法。

【請求項２２】　CFPで標識したIRBITまたはそのIP_3受容体結合ドメインを含むタンパク質と、VenusまたはYFPで標識したIP_3受容体の少なくともIP_3結合ドメインを含有するタンパク質とを用いることを特徴とする、請求項２０記載の方法。

【請求項２３】　生細胞の細胞内のIP_3濃度を定量する方法であって、

（i）　細胞に、FRET法が可能な２つの蛍光分子からなる組合わせのうちの一方で標識されたIRBITまたはそのIP_3受容体結合ドメインを含むタンパク質をコードする遺伝子、および上記組合せのうちの他方で標識されたIP_3受容体の少なくともIP_3結合ドメインを含有するタンパク質をコードする遺伝子を発現可能な形で導入して発現させ；

（ii）　該細胞を蛍光顕微鏡下で、上記の２つの蛍光分子のうち低波長側の蛍光分子の励起波長を照射して、該分子の蛍光波長と、他方の長波長側の蛍光分子の蛍光波長とを測定すること；

を含む上記方法。

【請求項２４】　FRET法が可能な２つの蛍光分子からなる組合わせが、VenusとCFPとの組合せ、YFPとCFPとの組合せ、またはFlAsHとCFPとの組合せである、請求項２３記載の方法。

【請求項２５】　IRBITまたはそのIP_3受容体結合ドメインを含むタンパク質とIP_3受容体またはその少なくともIP_3結合ドメインを含有するタンパク質からな

る、IP$_3$濃度を定量するためのタンパク質複合体。

【請求項２６】　FRET法が可能な２つの蛍光分子からなる組合わせのうちの一方で標識されたIRBITまたはそのIP$_3$受容体結合ドメインを含むタンパク質をコードする遺伝子、および上記組合せのうちの他方で標識されたIP$_3$受容体の少なくともIP$_3$結合ドメインを含有するタンパク質をコードする遺伝子を発現可能な形で含み、生細胞内のIP$_3$濃度を定量するためのベクター。

【請求項２７】　２つの蛍光分子からなる組合わせが、VenusとCFPとの組合せ、YFPとCFPとの組合せ、またはFlAsHとCFPとの組合せである、請求項２６記載のベクター。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】

本発明は、IP$_3$受容体に結合する新規タンパク質に関する。該タンパク質は、細胞内およびセルフリー(cell free)の系においてIP$_3$指示薬として有用である。

【０００２】

【従来の技術】

細胞膜上のレセプターの活性化に伴いホスファチジルイノシトール4,5-ビスホスフェート(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)が加水分解されると、細胞内セカンドメッセンジャーであるイノシトール1,4,5-三リン酸(inositol 1,4,5-trisphosphate (IP$_3$))が生成する。IP$_3$はIP$_3$受容体(IP$_3$R)に結合することにより、細胞内カルシウム貯蔵オルガネラ（主に小胞体）からのCa^{2+}放出を誘導する。このIP$_3$/Ca^{2+}シグナル経路において、IP$_3$受容体は、IP$_3$のシグナルをCa^{2+}のシグナルへ変換する役割を担っている(1-3)。

【０００３】

IP$_3$受容体は、4量体の細胞内IP$_3$-誘導性Ca^{2+} 放出チャネル（IP$_3$-gated Ca^{2+} release channel）である(3, 4)。哺乳動物では、3種の異なるIP$_3$受容体が存在する(5-7)。IP$_3$受容体タイプI(IP$_3$R1)は、中枢神経系、特に小脳において高発現している(8, 9)。マウスIP$_3$R1は、2749アミノ酸からなり(5)、３つの機能的に異なる領域に分かれている。すなわち、N末端近傍にIP$_3$結合ドメイン、C末端近

傍に６回膜貫通領域を有するチャネル形成ドメイン、およびこれら2つの領域のあいだに制御領域が存在する(10, 11)。IP_3結合ドメインの欠失突然変異体解析より、IP_3受容体のアミノ酸226～578残基が特異的かつ高親和性のリガンド結合に必要な最小領域であることが示され、IP_3結合コアと呼ばれている(12)。IP_3により誘発されるIP_3受容体チャネル開口の詳細な機序は未だ不明であるが、IP_3結合がIP_3受容体の何らかの立体構造変化を誘導することによって、チャネルの開口が起こると考えられる(10)。チャネルの開口以外にも、IP_3-誘導性の立体構造変化は、IP_3受容体の分解にも関与していると考えられる (13, 14)。

【０００４】

IP_3受容体の活性化による細胞質Ca^{2+}濃度の増加によって、多種多様な下流標的分子の活性が制御される。これら下流標的分子は、受精、発生、増殖、分泌、シナプス可塑性など多岐に渡る細胞応答において重要な役割を担っている (1-2, 15)。このような多岐に渡る細胞機能を制御するために、Ca^{2+}シグナルは、空間、時間、および濃度の点で厳密に制御される必要がある(2, 15)。このようなCa^{2+}シグナルの複雑な制御は、IP_3受容体アイソフォームの発現の多様性、IP_3受容体アイソフォームのヘテロ4量体の形成、IP_3受容体の細胞内分布、ならびにCa^{2+}自体、ATPおよびリン酸化によるIP_3受容体の制御によって部分的にになわれている (3-4, 16)。IP_3受容体チャネルはまた、カルモジュリン(18, 19)、FKBP12 (20-22、23-24)、カルシニューリン(21、25、23-24)、アンキリン (26-28)、σ-1受容体(28)、クロモグラニンAおよびB (29-31)、IRAG (32)、 Fyn (33)ならびにBANK (34)などの該チャネルと相互作用するタンパク質によっても制御される(4, 17)。さらに、CaBPと呼ばれるファミリーが、Ca^{2+}依存的にIP_3受容体と結合し、IP_3非存在下でIP_3受容体を直接活性化することが示された(35)。IP_3受容体はまた、タンパク質-タンパク質間相互作用によってその上流または下流のシグナル分子に物理的に会合していることが示されている。例えば、IP_3受容体は、Homerファミリータンパク質を介して代謝型グルタミン酸受容体グループ１(mGluRs)と結合し(36)、また、未知の機序によってB_2ブラジキニン受容体 (B_2Rs)と結合している(37)。mGluRsやB_2Rsの活性化によって、IP_3受容体に近接した位置でIP_3が産生され、効率的かつ特異的にシグナルが伝播される。

【０００５】

このように、IP_3分子は、様々な細胞機能を制御する重要なセカンドメッセンジャーであり、その細胞内の濃度は時間空間的に制御された形で変化していると考えられる。しかし、in vitroでのIP_3の定量に有効な指示薬として$[^3H]IP_3$を用いた方法が開発されているものの、放射性同位元素を使用するなどの点で簡便ではない。さらに、Ca^{2+}やcAMPといった他のセカンドメッセンジャーとは異なり、生細胞内のIP_3濃度変化の経時的な検出法は、GFP-プレクストリン相同性ドメイン(pleckstrin homology domain)の細胞膜から細胞質への移行をモニターすることにより検出する方法があるのみで、該方法も間接的、かつ定量性及び空間解像度の等の点で問題があるなど、必ずしも有効な方法ではない。このことが、細胞内IP_3動態解析の障害となっている。

【０００６】

【非特許文献１】

Berridge, M. J. (1993) Nature 361, 315-325

【非特許文献２】

Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2000) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1, 11-21

【非特許文献３】

Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1995) J. Neurochem. 64, 953-960

【非特許文献４】

Patel, S., Joseph, S. K., and Thomas, A. P. (1999) Cell Calcium 25, 247-264

【非特許文献５】

Furuichi, T., Yoshikawa, S., Miyawaki, A., Wada, K., Maeda, N., and Mikoshiba, K. (1989) Nature 342, 32-38

【非特許文献６】

Sudhof, T. C., Newton, C. L., Archer, B. T., III, Ushkaryov, U. A., and Mignery, G. A. (1991) EMBO J. 10, 3199-3206

【非特許文献７】

Blondel, O., Takeda, J., Janssen, H., Seino, S., and Bell, G. I. (1993) J. Biol. Chem. 268, 11356-11363

【非特許文献８】

Worley, P. F., Baraban, J. M., Colvin, J. S., and Snyder, S. H. (1987) Nature 325, 159-161

【非特許文献９】

Furuichi, T., Simon-Chazottes, D., Fujino, I., Yamada, N., Hasegawa, M., Miyawaki, A., Yoshikawa, S., Guenet, J.-L., and Mikoshiba, K. (1993) Recept. Channels 1, 11-24

【非特許文献１０】

Mignery, G. A., and Sudhof, T. C. (1990) EMBO J. 9, 3893-3898

【非特許文献１１】

Miyawaki, A., Furuichi, T., Ryou, Y., Yoshikawa, S., Nakagawa, T., Saitoh, T., and Mikoshiba, K. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4911-4915

【非特許文献１２】

Yoshikawa, F., Morita, M., Monkawa, T., Michikawa, T., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1996) J. Biol. Chem. 271, 18277-18284

【非特許文献１３】

Zhu, C.-C., Furuichi, T., Mikoshiba, K., and Wojcikiewicz, R. J. H. (1999) J. Biol. Chem. 274, 3476-3484

【非特許文献１４】

Zhu, C.-C., and Wojcikiewicz, R. J. H. (2000) Biochem. J. 348, 551-556

【非特許文献１５】

Berridge, M. J., Bootman, M. D., and Lipp, P. (1998) Nature 395, 645-648

【非特許文献１６】

Thrower, E. C., Hagar, R. E., and Ehrlich, B. E. (2001) Trends Pharmacol. Sci. 22, 580-586

【非特許文献１７】

Mackrill, J. J. (1999) Biochem. J. 337, 345-361

【非特許文献１８】

Patel, S., Morris, S. A., Adkins, C. E., O'beirne, G., and Taylor, C. W. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 11627-11632

【非特許文献１９】

Michikawa, T., Hirota, J., Kawano, S., Hiraoka, M., Yamada, M., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1999) Neuron 23, 799-808

【非特許文献２０】

Cameron, A. M., Steiner, J. P., Sabatini, D. M., Kaplin, A. I., Walensky, L. D., and Snyder, S. H. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 1784-1788

【非特許文献２１】

Cameron, A. M., Nucifora, F. C., Jr, Fung, E. T., Livingston, D. J., Aldape, R. A., Ross, C. A., and Snyder, S. H. (1997) J. Biol. Chem. 272, 27582-27588

【非特許文献２２】

Dargan, S. L., Lea, E. J. A., and Dawson, A. P. (2002) Biochem. J. 361, 401-407

【非特許文献２３】

Bultynck, G., De Smet, P., Weidema, A. F., Ver Heyen, M., Maes, K., Callewaert, G., Missiaen, L., Parys, J. B., and De Smedt, H. (2000) J. Physiol. 525, 681-693

【非特許文献２４】

Bultynck, G., De Smet, P., Rossi, D., Callewaert, G., Missiaen, L., Sorrentino, V., De Smedt, H., and Parys, J. B. (2001) Biochem. J. 354, 413-422

【非特許文献２５】

Cameron, A. M., Steiner, J. P., Roskams, A. J., Ali, S. M., Ronnett, G. V., and Snyder, S. H. (1995) Cell 83, 463-472

【非特許文献２６】

Joseph, S. K., and Samanta, S. (1993) J. Biol. Chem. 268, 6477-6486

【非特許文献２７】

Bourguignon, L. Y. W., Jin, H., Iida, N., Brandt, N. R., and Zhang, S. H. (1993) J. Biol. Chem. 268, 7290-7297

【非特許文献２８】

Hayashi, T., and Su, T.-P. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 491-496

【非特許文献２９】

Yoo, S. H., So, S. H., Kweon, H. S., Lee, J. S., Kang, M. K., and Jeon, C. J. (2000) J. Biol. Chem. 275, 12553-12559

【非特許文献３０】

Yoo, S. H., and Jeon, C. J. (2000) J. Biol. Chem. 275, 15067-15073

【非特許文献３１】

Thrower, E. C., Park, H. Y., So, S. H., Yoo, S. H., and Ehrlich, B. E. (2002) J. Biol. Chem. 277, 15801-15806

【非特許文献３２】

Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G.-X., Allescher, H.-D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F., and Ruth, P. (2000) Nature 404, 197-201

【非特許文献３３】

Jayaraman, T., Ondrias, K., Ondiasova, E., and Marks, A. R. (1996) Science 272, 1492-1494

【非特許文献３４】

Yokoyama, K., Su, I., Tezuka, T., Yasuda, T., Mikoshiba, K., Tarakhovsky, A., and Yamamoto, T. (2002) EMBO J. 21, 83-92

【非特許文献３５】

Yang, J., McBride, S., Mak, D.-O. D., Vardi, N., Palczewski, K., Haeseleer, F., and Foskett, J. K. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 7711-7716

【非特許文献３６】

Tu, J. C., Xiao, B., Yuan, J. P., Lanahan, A. A., Leoffert, K., Li, M., Linden, D. J., and Worley, P. F. (1998) Neuron 21, 717-726

【非特許文献３７】

Delmas, P., Wanaverbecq, N., Abogadie, F. C., Mistry, M., and Brown, D. A. (2002) Neuron 14, 209-220

【０００７】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、IP_3の検出および定量に有効な指示薬となる新規IP_3受容体結合タンパク質を提供し、ならびにそれを用いたIP_3の検出および/または定量方法を提供するものである。

【０００８】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために、IP_3受容体結合タンパク質、特に、IP_3受容体と相互作用し、かつ該相互作用がIP_3により制御されている分子に注目し、鋭意検討を行った。IP_3R1（アミノ酸配列を配列番号７に示している）の細胞質領域の大部分に当たるN末端2217アミノ酸残基を結合させたアフィニティカラムを用いて、IP_3で該カラムに結合したタンパク質を溶出することにより、新規IP_3受容体結合タンパク質を同定し、IRBIT(IP_3R binding protein released with inositol 1,4,5-trisphospate)と命名した。IRBITは、in vitroおよびin vivoでIP_3R1に結合し、その細胞内局在はIP_3R1とよく一致した。さらに、IRBITは生理的濃度のIP_3によりIP_3R1から解離することも判った。これらの結果から、IRBITはIP_3の指示薬として有用であると考え、本発明を完成させるに至った。

【０００９】

したがって、本発明は、以下の態様：

１．　以下の(a)、(b)または(c)のタンパク質、

(a)　配列番号１に示すアミノ酸配列を含むタンパク質

(b)　配列番号１に示すアミノ酸配列の1～104番目までのアミノ酸配列を含むタンパク質

(c)　配列番号１に示すアミノ酸配列またはその１～104番目までのアミノ

酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつIP_3受容体に結合するタンパク質

２．　上記１記載のタンパク質をコードする遺伝子、

３．　以下の(a)、(b)または(c)のDNAからなる遺伝子、

(a)　配列番号２に示す塩基配列を含むDNA

(b)　配列番号２に示す塩基配列の1～312番目までの塩基配列を含むDNA

(c)　(a)または(b)の塩基配列からなるDNAに相補的なDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつIP_3受容体に結合するタンパク質をコードするDNA

４．　上記２または３記載の遺伝子を含むベクター、

５．　上記２または３記載の遺伝子に、プロモーターが機能し得る形で連結されている、上記４記載のベクター、

６．　上記２または３記載の遺伝子を、蛍光または発光タンパク質をコードする遺伝子とインフレームで連結された形で含む、上記５記載のベクター、

７．　蛍光タンパク質が緑色蛍光タンパク質(GFP)、シアン蛍光タンパク質(CFP)、黄色蛍光タンパク質(YFP)、VenusおよびFlAsHならびにこれらの誘導体からなる群から選択される、上記６記載のベクター、

８．　上記４～７のいずれか1つ記載のベクターを含有する宿主細胞、

９．　哺乳動物細胞である、上記８記載の宿主細胞、

１０．　サンプル中のIP_3を検出するための、上記１記載のタンパク質を含むIP_3指示薬、

１１．　上記タンパク質が蛍光または発光タンパク質と融合されている、上記１０記載のIP_3指示薬、

１２．　上記タンパク質がFRET法が可能な２つの蛍光分子からなる組合わせのうちのいずれか一方の蛍光分子で標識されており、上記組合せのうちの他方の蛍光分子で標識されたIP_3受容体の少なくともIP_3結合ドメインを含有するタンパク質と組合わせてFRET法によりIP_3を検出するための、上記１１記載のIP_3指示薬、

１３．　２つの蛍光分子からなる組合わせが、VenusとCFPとの組合せ、YFPとCFPとの組合せ、またはFlAsHとCFPとの組合せである、上記１２記載のIP_3指示薬

、

１４．　上記１記載のタンパク質を特異的に認識する抗体またはその機能的フラグメント、

１５．　ウサギポリクローナル抗体またはそのフラグメントである、上記１４記載の抗体およびその機能的フラグメント、

１６．　サンプル中のIP_3濃度を測定するための方法であって、

(i)　IRBITまたはそのIP_3受容体結合ドメインを含むタンパク質とIP_3受容体の少なくともIP_3結合ドメインを含有するタンパク質からなるタンパク質複合体を調製し；

(ii)　上記タンパク質複合体とサンプルを接触させ；

(iii)　遊離IRBITもしくはそのIP_3受容体結合ドメインを含むタンパク質および/または上記複合体を定量すること；

を含む、上記方法、

１７．　上記(iii)における定量が、抗IRBIT抗体および/または抗IP_3受容体抗体を用いた免疫化学的反応系を利用して実施されることを特徴とする、上記１６記載の方法、

１８．　上記(iii)における定量が、IRBITもしくはそのIP_3受容体結合ドメインを含むタンパク質またはIP_3受容体の少なくともIP_3結合ドメインを含有するタンパク質を予め標識しておいて、該標識物に由来するシグナルを測定することにより実施されることを特徴とする、上記１６または１７記載の方法、

１９．　標識が蛍光標識である、上記１８記載の方法、

２０．　上記(iii)における定量が、FRET法により実施されることを特徴とする、上記１６記載の方法、

２１．　YFPもしくはVenusで標識したIRBITまたはそのIP_3受容体結合ドメインを含むタンパク質と、CFPで標識したIP_3受容体の少なくともIP_3結合ドメインを含有するタンパク質とを用いることを特徴とする、上記２０記載の方法、

２２．　CFPで標識したIRBITまたはそのIP_3受容体結合ドメインを含むタンパク質と、VenusまたはYFPで標識したIP_3受容体の少なくともIP_3結合ドメインを含有するタンパク質とを用いることを特徴とする、上記２０記載の方法、

２３．　生細胞の細胞内のIP_3濃度を定量する方法であって、

（i）　細胞に、FRET法が可能な２つの蛍光分子からなる組合わせのうちの一方で標識されたIRBITまたはそのIP_3受容体結合ドメインを含むタンパク質をコードする遺伝子、および上記組合せのうちの他方で標識されたIP_3受容体の少なくともIP_3結合ドメインを含有するタンパク質をコードする遺伝子を発現可能な形で導入して発現させ；

（ii）　該細胞を蛍光顕微鏡下で、上記の２つの蛍光分子のうち低波長側の蛍光分子の励起波長を照射して、該分子の蛍光波長と、他方の長波長側の蛍光分子の蛍光波長とを測定すること；

を含む上記方法、

２４．　FRET法が可能な２つの蛍光分子からなる組合わせが、VenusとCFPとの組合せ、YFPとCFPとの組合せ、またはFlAsHとCFPとの組合せである、上記２３記載の方法、

２５．　IRBITまたはそのIP_3受容体結合ドメインを含むタンパク質とIP_3受容体またはその少なくともIP_3結合ドメインを含有するタンパク質からなる、IP_3濃度を定量するためのタンパク質複合体、

２６．　FRET法が可能な２つの蛍光分子からなる組合わせのうちの一方で標識されたIRBITまたはそのIP_3受容体結合ドメインを含むタンパク質をコードする遺伝子、および上記組合せのうちの他方で標識されたIP_3受容体の少なくともIP_3結合ドメインを含有するタンパク質をコードする遺伝子を発現可能な形で含み、生細胞内のIP_3濃度を定量するためのベクター、ならびに

２７．　２つの蛍光分子からなる組合わせが、VenusとCFPとの組合せ、YFPとCFPとの組合せ、またはFlAsHとCFPとの組合せである、上記２６記載のベクター、

に関する。

【００１０】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を具体的に説明する。

【００１１】

本発明者らが新たにクローニングした新規IP_3受容体タンパク質であるIRBITは

、配列番号１に示すアミノ酸配列を含み、これはN末端領域(アミノ酸1～104)とC末端領域(アミノ酸105～530)とに分けられ、C末端領域はS-アデノシルホモシステインヒドロラーゼに相同性を有しているものの該酵素活性は示さず、N末端領域はIP_3受容体(本明細書中、IP_3受容体とはIP_3R1およびIP_3受容体タイプII(IP_3R2)を含むIP_3受容体の任意のサブタイプを指す)との結合に必須な領域である。該タンパク質の特徴としては、以下の：(1)中性タンパク質である(推定pI値：6.48)が、N末端領域は比較的酸性である(推定pI値：4.98)こと、(2)N末端領域に7つのリン酸化部位が集中的に局在しており、リン酸化がIP_3R1との相互作用に必要であると推測されること、(3) IP_3R1のIP_3との結合に必須である508番目のリジン残基がIRBITとの相互作用においても必須であること、(4) IP_3によりIP_3R1との相互作用が解離すること、および(5)高塩濃度により、IP_3R1との相互作用が解離し、かつ粗ミクロソーム画分から抽出されることから、IP_3R1との相互作用は静電気的結合によると推測されること：が挙げられる。

【００１２】

したがって、本発明は、IRBITタンパク質、IRBITのIP_3受容体への結合に必須な領域であるN末端領域(1～104番目のアミノ酸)、およびこれらのアミノ酸配列を含むタンパク質を包含する。場合によっては、IRBITの1～277番目のアミノ酸を含むタンパク質が好ましい。さらに、これらのタンパク質の変異体であって、IP_3受容体結合活性を保持したまま、1もしくは複数個のアミノ酸、好ましくは1～50個、より好ましくは1～20個、さらに好ましくは1～10個、特に好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ配列を含むタンパク質もまた、本発明に包含される。

【００１３】

さらに、これらのタンパク質をコードする遺伝子も本発明に包含される。該遺伝子は、例えばIRBITタンパク質をコードする配列番号２に示す塩基配列、またはIRBITのIP_3受容体結合ドメインであるN末端領域(1～104番目のアミノ酸)をコードする配列番号２に示す塩基配列の1～312番目までの塩基配列を含むDNAである。また、これらのDNAまたはその相補鎖DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAをも含む。ここで、ストリンジェントな条件とは、例えば、

ナトリウム濃度が10mM～300mMであり、好ましくは37～65℃、より好ましくは42℃である条件をいう。あるいは、このような条件は、ECL^{TM} direct nucleic acid labeling and detection system (Amersham Pharmacia製)を用いて、添付されている説明書の記載に従うことにより達成することができる。さらに、配列番号２の塩基配列またはその１～312番目までの塩基配列において１もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を含み、かつIP_3受容体結合活性を有するタンパク質をコードするものも含む。ここで、欠失、置換または付加を受ける塩基の数は特に制限されないが、好ましくは１～100個、より好ましくは１～50個、さらに好ましくは１～20個、最も好ましくは1～10個である。このような核酸の塩基配列としては、配列番号１に表される塩基配列との相同性が、BLAST等を用いて計算したときに（例えば、BLASTのデフォルトすなわち初期条件のパラメーターを用いた場合）、70％以上、好ましくは90％以上、より好ましくは95％以上、96％以上、97％以上、98％以上もしくは99％以上である。さらに、これらのDNAに対応するRNA、これらのDNAを含むベクター、上記DNAが発現可能なように該DNAにプロモーターが機能し得る形で連結されているベクター、および上記DNAの発現産物(IRBIT分子等)を標識化するための何らかの標識物をコードするDNAと上記DNAがインフレームで連結されているベクター、さらにはこれらのベクターを含有する宿主細胞(昆虫細胞、大腸菌および哺乳動物細胞が好ましいが、これらに限定はされない)も、本発明に包含される。上記標識物は、ヒスチジンタグ(His-tag)、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）およびビオチン等の免疫学的反応またはタンパク質間結合を利用するための標識でもよく、緑色蛍光タンパク質（GFP）CFP、Venus、FlAsHおよびReAsHならびにこれらの誘導体などの蛍光または発光タンパク質であってもよいが、これらに限定されることはなく、公知のあらゆる標識物のうちの任意のものであってよい。

【００１４】

さらに、IRBITはIP_3により選択的かつ濃度依存的に、IP_3受容体から解離し得るタンパク質である。例えば、IP_3受容体をIP_3受容体タイプIとした場合、その上記解離に対するEC50値は約0.5μMである。この値は従来法によるIP_3結合アッセイにより測定されたIP_3R1のIP_3への結合におけるKd値(Kd＝83～100 nM：60, 6

1)より高いが、この差は、IP_3のIP_3受容体への結合親和性はpHおよびイオン強度に大きく依存していることから(62-64)、おそらくバッファー条件が異なる(該アッセイでは、pH8.0～8.3、低イオン強度の条件で測定している)ことに起因するのではないかと考えられる。従来法とは異なる表面プラズモンレゾナンスバイオセンサーによる研究では、IP_3R1のN末端領域(アミノ酸1～604)について生理的条件下(pH7.4、150 mM NaCl)で測定するとKd値は336 nMであり(64)、これは従来法によるKd値と比較して親和性が約7.5倍低いことを示す。この値は、IRBITのIP_3R1(本発明においては、実験の利便性のためにGST融合タンパク質を用いており、これをGST-ELと本明細書中では呼ぶ)との相互作用の解離におけるEC50値(約0.5 μM：pH7.4、100 mM NaCl下で測定)に近い。以上のことから、IRBITはIP_3受容体にIP_3が結合することによりIP_3受容体と解離すると考えられる。これを支持するデータとして、Luzziらが検出細胞/キャピラリー電気泳動システムを用いて測定した結果によると、IP_3の細胞内濃度は、刺激前は数十nMであり刺激後は数μMに上昇するとされている (50) 。上述のとおりIP_3R1からのIRBITの解離に対するIP_3のEC50値が約0.5μMであり、この値は、刺激前と刺激後の細胞内IP_3濃度の変化範囲に含まれており、IRBITは細胞外刺激により誘導されるIP_3産生後にIP_3受容体から解離することが強く示唆される。

【００１５】

IP_3により濃度依存的にIP_3受容体から解離するというIRBITの特性によって、IRBITまたはそのIP_3受容体結合ドメインを少なくとも含有するタンパク質を新規IP_3指示薬として利用できる。すなわち、例えばIRBITを用いる場合、対象とするサンプルを、IRBIT-IP_3受容体複合体（この際のIP_3受容体は完全な分子である必要はなく、IP_3とIRBITの両方が結合できる領域を少なくとも含むフラグメント（以下、IP_3BDと称する）でよい）と接触させて、IP_3受容体から解離したIRBITの量を定量するか、逆にIP_3との接触後に残存するIRBIT-IP_3受容体/IP_3BD複合体を定量することにより、IP_3の定量的検出が可能となる。IRBITのIP_3受容体結合ドメインを少なくとも含有するタンパク質を用いた場合も同様である。

【００１６】

遊離IRBITまたはIRBIT-IP_3受容体複合体の定量的検出は、免疫学的手法によっ

ても可能である。

【００１７】

本明細書において「抗体」という用語は、完全な抗体分子およびその完全な抗体に由来する抗原結合能を保持しているフラグメント、およびこれらの誘導体を含む。IRBITに対する抗体はモノクローナルまたはポリクローナル抗体であってよく、いずれの場合も、IRBIT分子またはその一部のペプチドを動物に免疫することによる一般的な方法で取得できる。これらの抗体分子を精製する方法、およびIRBITに対する結合性を有する抗体の断片に切断してこれを精製する方法もまた当業者には公知であり、所望により適切な方法を選択することができる。これらの抗体分子を用いて、遊離IRBITを検出することは、当業者であれば容易に達成し得る。また、該抗体分子を用いてIRBIT-IP$_3$受容体/IP$_3$BD複合体を検出する方法も、当業者であれば容易に達成し得る。例えば、IP$_3$R1を予め固相支持体（ビーズ、またはアッセイプレート表面等）に結合させておき、IP$_3$R1を介して固相に結合しているIRBITを検出するとよい。

【００１８】

さらに、IRBITを適切な分子で標識化し、該標識を検出することにより遊離IRBITまたはIRBIT-IP$_3$受容体/IP$_3$BDの定量的検出が可能である。標識は、放射性標識、免疫標識、色素標識、蛍光標識または発光標識等、タンパク質の標識物として公知である標識分子のうち任意のものを該標識分子に応じた公知の方法でIRBIT分子に結合させることにより達成できる。また、使用する標識によって、その標識に由来するシグナルを検出することは、当業者であれば公知技術に基づいて容易に達成できる。

【００１９】

まず、IRBITまたはそのIP$_3$受容体結合ドメインを少なくとも含むタンパク質とIP$_3$受容体またはIP$_3$BDからなる複合体(IRBIT-IP$_3$受容体/IP$_3$BD複合体と称する)を調製する。IRBITは細胞内でIP$_3$受容体と複合体を形成するため、IP$_3$受容体を発現する天然の細胞（小脳神経細胞等）から精製することもできるが、IRBITまたはそのIP$_3$受容体結合ドメインを少なくとも含むタンパク質とIP$_3$受容体分子またはIP$_3$BDを含むタンパク質を強制発現させた細胞（大腸菌またはSf9細胞等）か

ら、生化学的分画法によりミクロソーム画分を分画してもよい。あるいは、分子標識物（ヒスチジンタグ等）が付いた形で上記タンパク質を強制発現させて、細胞溶解液から標識物を利用して抽出することもできる。場合によっては、その他公知の精製法（カラムクロマトグラフィーなど）を用いてもよい。

【００２０】

さらに、IRBITとIP_3BDを別々にそれぞれ調製し、複合体を形成させることも可能である。すなわち、例えば、GST-IP_3BDを大腸菌で発現させてグルタチオン-セファロースで精製し、IRBITまたはそのIP_3受容体結合領域を含むタンパク質を大腸菌またはSf9細胞で発現させる。該IRBITまたはそのIP_3受容体結合領域を含むタンパク質をGST-IP_3BDと接触させることにより複合体を形成させ、グルタチオン-セファロースでプルダウンすることにより該複合体を精製できる。あるいはまた、小脳高塩抽出画分などより、組織中のIRBITをGST-IP_3BDとグルタチオン-セファロースでプルダウンすることにより上記複合体を調製してもよい。

【００２１】

調製したIRBIT-IP_3受容体/IP_3BD複合体（1～100μM程度に10 mM Hepes、100 mM NaCl、2 mM EDTA、1 mM 2-ME、pH7.4中にて調製する）にIP_3を含むサンプルを接触させて、5～30分程度氷上でインキュベートした後、該溶液中に存在する遊離IRBITまたは残存するIRBIT-IP_3受容体/IP_3BD複合体を検出する。反応に用いるIRBIT-IP_3受容体/IP_3BD複合体を予め固相担体に結合させておき、反応後固相担体を液相から分離して液相中の遊離IRBITを検出するか、または固相担体に結合しているIRBIT-IP_3受容体/IP_3BD複合体中のIRBITを検出することもできる。IRBITの検出は、IRBITを認識する抗体を用いて免疫学的反応系により行ってもよく、また標識化IRBITを用いた場合には該標識を検出することで行ってもよい。

【００２２】

さらに、本発明の１実施形態では、蛍光のエネルギー移動（fluorescence resonance energy transfer, FRET）を利用した方法により、IP_3を定量することも可能である。

【００２３】

蛍光のエネルギー移動（FRET）とは、２つの蛍光団が互いに近距離で適切な位

置関係にある時に、一方の蛍光団（エネルギー供与体(donor)）から、もう一つのより長波長側の蛍光団（エネルギー受容体(acceptor)）へ励起エネルギーが移動する現象である。2つの分子を特定の2種の蛍光分子で標識することにより、その２つの分子間の相互作用の変化をFRET効率の変化として測定することができる。また、分子間の相互作用を制御する別の分子の濃度変化を測定することも可能となる。

【００２４】

FRET法により、細胞内Ca^{2+}濃度変化の検出法(72)またはｃAMP濃度変化の検出法(71)等が開発されている。

【００２５】

IRBITはIP_3受容体のIP_3BDに結合しており、IP_3によりIP_3受容体から解離する。この性質を利用し、IRBITとIP_3BDを各々FRETが可能な2種の蛍光標識からなる組合わせのそれぞれで標識することにより、in vitroあるいは細胞内でのIP_3濃度変化を検出することができる。すなわち、例えば、IRBITを例えば黄色蛍光タンパク質（YFP)またはその改良体であるVenusで標識し、IP_3BDをシアン蛍光タンパク質(CFP)で標識する。IP_3非存在下ではIRBITはIP_3BDに結合しておりCFPからVenusにFRETが起こるが、IP_3存在下では両者は解離し、FRETが起こらなくなる。さらにVenus-IRBITとCFP-IP_3BDをリンカー配列を介して結合させる（Venus-IRBIT-IP_3BD-CFP）と両者のモル比が等しくなり、効率的である。in vitroでIP_3濃度を測定する場合は、細胞の抽出液などにVenus-IRBIT-IP_3BD-CFPタンパク質を加え、FRETを測定する。また、Venus-IRBIT-IP_3BD-CFPの遺伝子を細胞内に導入させれば、生きた細胞内のIP_3濃度変化を時間空間的に解析することができる。FRET法の測定は、蛍光顕微鏡または蛍光計等で測定することができる。

【００２６】

FRET法によるIP_3検出法の例をさらに詳細に以下に記載する。

まず、Venus-IRBIT-IP_3BD-CFP発現ベクターを作成する。IRBIT全長またはIP_3BDとの結合に必要十分な領域を含むその欠失変異体（例えば、アミノ酸1～104またはアミノ酸1～277からなる変異体）、マウスIP_3受容体タイプIのIP_3結合領域（配列番号７のアミノ酸224～604からなる領域）を含むタンパク質、Venusおよ

びCFPの4つのcDNAをPCRで増幅し、フレームが合うように哺乳動物細胞発現ベクター（pcDNA3など）に挿入する。順番は、例えばVenus-IRBIT-IP$_3$BD-CFPのように内側２つにIRBITとIP$_3$BD、外側２つにVenusとCFPというようにすれば、特に制約はない。リコンビナントタンパク質調製用には、大腸菌発現用ベクター（pETなど）あるいはSf9発現用ベクター（pFastBacなど）に挿入する。この場合は精製用にタグ（Hisタグなど）をN末端あるいはC末端に付加する。

【００２７】

Venus-IRBIT-IP$_3$BD-CFPを大腸菌あるいはSf9細胞で発現させ、Hisタグを付けた場合はProBond resin（Invitorgen）などで精製する。場合によってはイオン交換カラム、ゲルろ過カラムで精製してもよい。

【００２８】

精製したVenus-IRBIT-IP$_3$BD-CFPタンパク質に、濃度の分かっているIP$_3$溶液を添加し、CFPの励起波長（440 nm付近）をあて、CFPの蛍光波長（480 nm付近、CFP蛍光）と、Venusの蛍光波長（535 nm付近、FRET蛍光）を測定する。IP$_3$濃度とFRET蛍光/CFP蛍光比をプロットすることにより、検量線を決定する。IP$_3$濃度が未知のサンプル（細胞抽出液など）にVenus-IRBIT-IP$_3$BD-CFPタンパク質を添加し、FRET蛍光/CFP蛍光比を求め、検量線と比較することにより、IP$_3$濃度を定量する。

【００２９】

生細胞中のIP$_3$濃度もまた、FRET法により測定できる。まず、pcDNA-Venus-IRBIT-IP$_3$BD-CFPを培養細胞（Cos-7、HeLaなど）に遺伝子導入試薬（Trans IT（Mirus)など）で遺伝子導入する。遺伝子導入してから1～3日後のグラスボトムディッシュ上の細胞を冷却CCDカメラ付き倒立型蛍光顕微鏡（IX71（Olympus)など）で観察する。CFPの励起波長（440 nm付近）をあて、CFPの蛍光波長（480 nm付近、CFP蛍光）と、Venusの蛍光波長（535 nm付近、FRET蛍光）を測定する。両者の蛍光強度の比をとることによりFRET効率を定量する。IP$_3$を産生するアゴニスト（Cos-7の場合はATP、HeLaの場合はヒスタミンなど）をグラスボトムディッシュに添加し、FRET効率を経時的に測定する。アゴニストによりIP$_3$が産生されれば、FRET/CFPの比が低下することが期待される。

【００３０】

上記にVenusとCFPの組合せの蛍光標識を用いた場合について例示的に述べたが、この組み合わせは、YFPとCFPまたはFlAsHとCFPでも可能であり、またこれらに限定されない。さらに、FRET法に用いるための蛍光分子は今後種々のものが開発されるであろうと予測されるが、それらもまた本発明の実施に使用可能であろう。

【００３１】

また、本発明のIP$_3$検出方法に使用するための本発明のIP$_3$指示薬またはIP$_3$検出用キットもまた、本発明に包含される。該指示薬またはキットには、IRBITの少なくともIP$_3$受容体結合領域を含むタンパク質またはこれをコードするDNAもしくはRNAが含まれている。場合によっては、IP$_3$受容体の少なくともIP$_3$結合領域を含むタンパク質またはコードするDNAもしくはRNAを含む。さらに、標識試薬（蛍光標識化合物等）および/または上記タンパク質を認識する抗体を含んでいてもよい。

【００３２】

【実施例】

以下に実施例を示し、本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらによって制限されるものではない。

【００３３】

方法

IP$_3$R1アフィニティカラムの作製

マウスIP$_3$R1のN末端領域(アミノ酸１～225)をコードするcDNAをグルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）融合ベクターpGEX-KGに挿入した(40)。該GST-IR$_3$R1(1-225)断片をバキュロウイルストランスファーベクターpBlueBac4.5(Invitorogen)にサブクローニングした。該GST-IR$_3$R1(1-225)のSmaI部位より下流の領域を、マウスIP$_3$R1(アミノ酸79～2217に相当)のSmaI-EcoRI断片で置き換え、GST-IP$_3$R1(1-2217)ベクター(GST-ELと命名した)を構築した。コントロールとしてGSTのみをコードする断片をpBlueBac4.5にサブクローニングした。Sf9細胞は27℃で10%ウシ胎仔血清を添加したTNM-FH培地で培養した。GST-ELまたはGST遺伝子を持つ

組換えバキュロウイルスをBac-N-Blue(商標)トランスフェクションキット(Invitrogen)を用いて、添付の説明書にしたがって作製した。感染多重度５で組換えバキュロウイルスを感染させて48時間インキュベートすることにより、GST-ELおよびGSTを２×10^8個のSf9細胞で発現させた。細胞を回収後-80℃で保存した。凍結保存しておいた細胞を10 mM Hepes (pH 7.4)、100 mM NaCl、2 mM EDTA、1 mM 2-メルカプトエタノール(2-ME)、0.1% Triton X-100、およびプロテアーゼインヒビター(1 mM フェニルメチルスフホニルフロライド(PMSF)、10 μM ロイペプチン、2 μM ペプスタチンA および10 μM E-64)に懸濁し、ガラステフロンホモジナイザーでホモジナイズした(1000 rpm、10ストローク)。ホモジネートを20,000 x gで 30分遠心し、上清を 3 mlのグルタチオン-セファロース 4B (Amersham Pharmacia Biotech)と共に3時間 4℃でインキュベートした。40 mlの10 mM Hepes (pH 7.4)、250 mM NaCl、2 mM EDTA、1 mM 2-MEおよび0.1% Triton X-100で8回洗浄後、グルタチオン-セファロースに結合した GST-ELまたはGSTをカラムに充填して10 mM Hepes (pH 7.4)、100 mM NaCl、2 mM EDTA、1 mM 2-MEおよび0.1% Triton X-100で平衡化した。約5mgのGST-ELを固定化した。

【００３４】

IRBITの精製および部分アミノ酸配列決定

成熟ラット小脳(約5g)をホモジナイズバッファー(10 mM Hepes (pH 7.4)、20 mM ショ糖、 2 mM EDTA、1 mM 2-ME、およびプロテアーゼインヒビター)45ml中でガラステフロンホモジナイザーでホモジナイズした(950 rpm、10 ストローク)。ホモジネートを1,000 x gで10分間遠心し、上清(S1画分)をさらに100,000 x gで60分間遠心して、細胞質画分(上清)と粗ミクロソーム画分(ペレット)とを得た。粗ミクロソーム画分を、500 mM NaClを含むホモジナイズバッファー25ml中でガラステフロンホモジナイザーでホモジナイズし(1,200 rpm、10 ストローク)、15分氷上でインキュベート後、100,000 x gで60分間遠心して高塩抽出画分(上清)と高塩抽出後粗ミクロソーム画分(ペレット)とを得た。高塩抽出画分を希釈バッファー(10 mM Hepes (pH 7.4)、2 mM EDTA、1 mM 2-ME、 0.01% Brij 35、およびプロテアーゼインヒビター)で5倍希釈し、希釈した高塩抽出画分をグルタチオン-セファロースで前処理した後、結合バッファー (10 mM Hepes (pH 7.4)、1

00 mM NaCl、2 mM EDTA、および1 mM 2-ME)で平衡化しておいたGST-EL アフィニティカラムに添加した。コントロールとしてGSTカラムを用いた。カラム容量の20倍の結合バッファーにてカラムを洗浄した後、50 μM IP_3 (Dojindo)と0.05% Brij 35とを含む結合バッファーでカラムに結合しているタンパク質を溶出させた。溶出液を濃縮して、10%のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)で分離してクマシーブリリアントブルー(CBB)で染色した。約60kDaの位置にあるタンパク質のバンドをゲルから切り出し、公知の方法(41)に従いリジルエンドペプチドチダーゼ(Wako)で切断した。切断したペプチドをSMARTシステム(Amersham Pharmacia Biotech)につないだC-18 逆相カラム(μRPC C2/C18 SC 2.1/10、Amersham Pharmacia Biotech)で分離した。各ペプチドのアミノ酸配列を494 procise protein sequencer (Applied Biosystems)で配列決定したところ、2つのペプチド配列、N-YSFMATVTK-C（配列番号３）およびN-QIQFADDMQEFTK-C（配列番号４）が得られた。

【００３５】

IRBITのcDNAクローニング

上記60kDaのタンパク質から得られた上記2つのペプチド配列を非重複データベース(non-redundant database)についてBLAST検索したところ、これらの配列は、データベース中の１つの配列(登録番号 CAC09285)にマッチした。マウス発現配列タグのデータベース(登録番号AW229870およびBE282170)に基づいて、該cDNAに相同的なプライマー(5'-ATGTCGATGCCTGACGCGATGC-3'（配列番号５）および5'-GCGTGGTTCATGTGGACTGGTC-3'（配列番号６））を合成した。IRBITのcDNAを、oligo dT-プライマーを用いて合成したマウス小脳第1鎖cDNAをテンプレートとしてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)にて増幅させた。PCR産物をpBluescript II KS(+) (Stratagene)にクローニングして配列決定した。3つの独立クローンの配列を確認した。

【００３６】

組換えタンパク質の調製

IRBITの全長およびN末端(アミノ酸1～104)をコードするcDNAを、大腸菌ヘキサヒスチジン(His) 融合ベクターpET-23a(+) (Novagen)にサブクローニングして、

各々IRBIT-HisおよびIRBIT(1-104)-His 発現ベクターを作製した。同じcDNAをGST融合ベクター pGEX-4T-1 (Amersham Pharmacia Biotech) にサブクローニングし、各々GST-IRBITおよびGST-IRBIT(1-104) 発現ベクターを作製した。マウスIP$_3$R1のアミノ酸配列(配列番号７)のアミノ酸1～225、1～343、341～923、600～1248、916～1581および1553～1943をコードするcDNA断片を pGEX-KGに挿入して、各々GST-Ia、GST-Iab、GST-IIab、 GST-IIbIIIa、GST-IIIabおよびGST-IV発現ベクターとした。マウスIP$_3$R1のアミノ酸1593～2217をpGEX-4T-1に挿入してGST-IV-Va発現ベクターを得た。これらの融合タンパク質を大腸菌で発現させた。GST-ELは、上記のようにしてSf9 細胞で発現させた。発現されたHis-タグ融合タンパク質はProBond樹脂(Invitrogen)を用いて精製し、GST融合タンパク質は、グルタチオン-セファロースで精製した。GST-IbIIa(マウスIP$_3$R1のアミノ酸224～604)とその部位特異的突然変異K508AおよびR441Qは既に公知であるものを用いた(引用文献42参照のこと、GST-IbIIaは該文献中G224と称されている)。

【００３７】

酵素活性測定

S-アデノシルホモシステインヒドロラーゼの加水分解方向への活性を測定するために、公知の方法に(43)したがって、精製したIRBIT-His(3.0 μg)、GST-IRBIT(4.3 μg)、GST(1.3 μg)およウサギS-アデノシルホモシステインヒドロラーゼ(Sigma) (2.4 μg)を用いて、生成産物(ホモシステイン)と5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(Sigma)との反応による発色を光学的に測定した。 412 nmでの吸光度を、DU 640分光光度計(Beckman)にて0、5、20および60分後に測定した。3回の独立した実験結果を平均 ± 標準偏差で示した(図2)。

【００３８】

アフィニティ精製用抗IRBIT抗体の作製

ニホンシロウサギに、精製IRBIT(1-104)-Hisを、完全フロイントアジュバントと共に14日間隔で皮下注射して免疫した。抗IRBIT抗血清を、シアノジェンブロマイド-活性化セファロース4B(Amersham Pharmacia Biotech)に共有結合させたGST-IRBIT(1-104)に通し、該カラムに特異的に結合した抗体を100 mM グリシン-HCl (pH 2.5)で溶出した。

【００３９】

細胞画分の調製およびイムノブロッティング

大脳、小脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、精巣および卵巣を、成熟マウスより摘出してS1画分を上記方法により得た。マウス小脳の細胞質画分、粗ミクロソーム画分、高塩抽出画分、および高塩抽出後粗ミクロソーム画分を、上記と同様の方法により得た。図に示す量のタンパク質を10％SDS-PAGEに供し、ポリビニリデンフルオライド(PVDF)膜に電気的に転写した。ブロッキングした後に、該膜を抗IRBIT抗体(1 μg/ml)で室温にて1時間インキュベートし、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ロバ抗ウサギIgG(Amersham Pharmacia Biotech)でブロットした。免疫反応したバンドを、増幅化学発光検出システム (enhanced chemiluminescence detection system；Amersham Pharmacia Biotech) で検出した。

【００４０】

ほ乳細胞発現ベクターの作製とトランスフェクション

全長IRBITをコードするcDNAをpcDNA3 (Invitrogen)にサブクローニングした。全長IRBITまたはその欠失変異体(アミノ酸1～277、1～104、および105～530)をコードするcDNAをpEGFP-C1 (Clontech)にサブクローニングして、緑色蛍光タンパク質(GFP)融合タンパク質発現ベクターを作製した。マウスIP_3R1発現ベクターpBact-STneoB-C1は既に公開されているものを用いた(44)。Cos-7細胞を10％ウシ胎仔血清、ペニシリンおよびストレプトマイシンを添加したDMEM培地中で37℃にて培養した。TransIT transfection reagents (Mirus)を用いて、添付の説明書にしたがって、一過性遺伝子導入を行った。遺伝子導入してから2日後の細胞をイムノブロッティング、プルダウン実験、または免疫染色に用いた。

【００４１】

in vitro結合実験

マウス小脳細胞質画分を10 mM Hepes (pH 7.4)、 200 mM NaCl、 2 mM EDTA、1 mM 2-ME および0.02% Triton X-100で２倍希釈した。高塩抽出画分は、10 mM Hepes (pH 7.4)、2 mM EDTA、1 mM 2-MEおよび0.01% Triton X-100で5倍希釈した。希釈した画分を(両画分ともNaCl最終濃度は100 mM)を20 μgのGST-ELまたはGSTと4℃にて2時間インキュベートした。10 μlのグルタチオン-セファロースを

添加してさらに2時間インキュベートし、該樹脂を洗浄バッファー(10 mM Hepes (pH 7.4)、100 mM NaCl、2 mM EDTA、1 mM 2-ME、and 0.01% Triton X-100)で5回洗浄した後、結合したタンパク質を20mMのグルタチオンで溶出させた。溶出したタンパク質は抗IRBIT抗体によるウェスタンブロットにより解析した。

【００４２】

脱リン酸化のためには、希釈した高塩抽出画分を大腸菌アルカリホスファターゼ(Toyobo)の存在下または非存在下のいずれかで2 mM $MgCl_2$と共に37℃にて30分インキュベート後、5 mMのEDTAを添加して、上述のとおりプルダウンアッセイに供した。

【００４３】

解離実験には、希釈した高塩抽出画分中のIRBITをGST-ELを用いて、上述のとおりプルダウンにより沈降させて洗浄の後、IP_3、イノシトール4,5-二リン酸(IP_2) (Dojindo)、イノシトール1,3,4,5-四リン酸(IP_4) (Calbiochem)、イノシトール1,2,3,4,5,6-六リン酸(IP_6)(Calbiochem)またはATP(Amersham Pharmacia Biotech) (各0.1、0.3、1、3または10 μM)を含む洗浄バッファー100μlを、樹脂に添加した。氷上で10分間インキュベートした後、サンプルを10,000 rpmで1分間遠心し、その上清を抗IRBIT抗体またはヤギ抗GST抗体(Amersham Pharmacia Biotech)によるイムノブロットに供した。定量化のために、Alexa 680-結合ヤギ抗ウサギIgG (Molecular Probes)を二次抗体として用いた。IRBITの免疫反応性のバンドの蛍光強度は、Odyssey infrared imaging system (Aloka)で測定した。定量データ(少なくとも3回の独立した実験の平均±SD)は、10μMの IP_3溶出物中のIRBITの量に対する比率で示した。

【００４４】

IP_3R1のIRBIT結合領域およびIRBIT結合に必要なアミノ酸残基を特定するために、希釈した高塩抽出画分を100 pmol のGST、GST-EL、GST-Ia、GST-Iab、 GST-IbIIa、 GST-IIab、GST-IIbIIIa、GST-IIIab、GST-IV、GST-IV-Va、K508AまたはR441Qを用いて上述のとおりプルダウンアッセイに供し、抗IRBIT抗体にてウェスタンブロッティングにより解析した。

【００４５】

IRBITのIP_3R1-結合領域の同定は、GFP-タグ付き全長IRBITまたはこれの末端欠失型変異体を発現するCos-7細胞を溶解バッファー(10 mM Hepes (pH7.4)、100 mM NaCl、2 mM EDTA、1 mM 2-ME、0.5% Nonidet P-40、およびプロテアーゼインヒビター)で4℃にて30分間溶解させて遠心した(100,000 x g、 30分)。上清を、GST-ELまたはGSTで上述のとおりプルダウンアッセイに供し、結合したタンパク質を抗GFP抗体(Medical & Biological Laboratories)でイムノブロット解析に供した。

【００４６】

間接的免疫蛍光法および共焦点顕微鏡法

遺伝子導入したCos-7細胞をガラスカバースリップ上で培養して、生理的リン酸バッファー(PBS)で1度洗浄して4% ホルムアルデヒド含有 PBSで15分間固定化し、0.1% Triton X-100含有PBSで5分間、膜透過処理した後、2%のヤギ血清を含むPBSで室温にて60分間ブロッキングした。細胞質中のタンパク質を洗い流すために、遺伝子導入した細胞を氷冷した0.1%サポニン含有細胞膜透過化バッファー(80 mM PIPES (pH 7.2)、1 mM $MgCl_2$、1 mM EGTAおよび4% ポリエチレングリコール)中で細胞膜に穴をあけ、氷冷細胞膜透過化バッファーで2回洗浄した後、固定化した。その後細胞に、ウサギ抗IRBIT抗体(1μg/ml、室温、60分)およびラット抗IP_3R1抗体18A10(45)(4℃にて一晩)を反応させた。PBSで5分間洗浄した後、Alexa 488-結合ヤギ抗ウサギIgGおよびAlexa 594-結合ヤギ抗ラットIgG(Molecular Probes)を37℃で45分間反応させた。PBSにて5分間ずつ4回洗浄した後、カバースリップをVectashield (Vector Laboratories)でマウントしてIX-70共焦点蛍光顕微鏡(Olympus)を用いて60倍の対物レンズで観察した。

【００４７】

免疫沈降

1% Nonidet P-40を含む50 mM Hepes (pH7.4)、1 mM $MgCl_2$およびプロテアーゼインヒビターで4℃にて30分間処理することにより、粗ミクロソームから界面活性剤可溶化抽出物を得、20,000 x gで30分間遠心した。上清を免疫沈降バッファー(10 mM Hepes (pH7.4)、150 mM NaCl、1 mM $MgCl_2$、および1% Nonidet P-40)にて10倍に希釈し、ウサギ抗IRBIT抗体(3μg)あるいはコントロールウサギIgG(3 μg)と共に4℃にて2時間インキュベートした。免疫複合体を、プロテインG セファロース4ファストフロー(Amersham Pharmacia Biotech)を添加して4℃にて2時間反応させた。樹脂を免疫沈降バッファーで3回洗浄して抗IRBIT抗体またはマウス抗IP_3R1抗体 KM1112(47)によるウエスタンブロットに供した。

【００４８】

結果

新規IP_3R結合タンパク質の精製およびcDNAクローニング

IP_3受容体と相互作用する分子を同定するために、マウスIP_3R1のIP_3結合ドメインおよび制御ドメインを含む細胞質領域(10, 11)の大部分をコードするN末端2217アミノ酸領域を、GSTとの融合タンパク質(GST-EL)として用いた。GST-ELおよびGSTをバキュロウイルス/Sf9細胞系により発現させて、グルタチオン-セファロースに結合させた。小脳の粗ミクロソーム画分から高塩濃度バッファー(500mMのNaClを含む)で抽出される画分は、膜結合タンパク質に富んだ画分であると考えられ、これをGST-ELまたはGSTを固定化したグルタチオン-セファロースアフィニティカラムに添加した。IP_3が存在するとIP_3受容体から解離するタンパク質を検出すべく、50μMのIP_3を用いてアフィニティカラムに結合したタンパク質の溶出を行ったところ、GST-ELカラムから分子量約60kDaのタンパク質が溶出されたが(図１Ａ)、GSTカラムからはこのようなタンパク質は溶出されず(データは示していない)、かかるタンパク質がIP_3R1に特異的に結合するタンパク質であることが示唆された。かかる60kDaのタンパク質に由来する2つのペプチドの配列を決定し、非重複データベースのBLAST検索を行ったところ、これらの2つの配列はデータベース中のあるヒト由来cDNAの配列とマッチした。このcDNAに相同性のあるマウス発現配列タグの配列情報に基づいて、マウス小脳から逆転写PCRにより、上記60kDaタンパク質のcDNAを得た。クローニングされたcDNAの推定アミノ酸配列から530アミノ酸残基からなるタンパク質であることが示された(図１Ｂ)。計算上の分子量は58.9kDaであり、SDS-PAGEによって推定された分子量とほぼ一致していた。この60kDaの分子をIRBITと名付けた。

【００４９】

IRBITのC末端領域(アミノ酸105～530)はメチル化経路の酵素S-アデノシルホモ

システインヒドロラーゼ(EC 3.3.1.1.)(48)に対して相同性(同一性51%、類似性74%)を有していることが明らかとなった(Fig. 1, CおよびD)。IRBITのN末端側の領域(アミノ酸1～104)は、既知のタンパク質との相同性はなく、セリンに富んだ領域(アミノ酸62～103)を含んでいた(Fig. 1, BおよびD)。IRBITの配列のモチーフ検索によって、推定コイルドコイルモチーフ(アミノ酸111～138)および推定NAD^+結合領域(アミノ酸314～344)が存在することが明らかとなった(図１BおよびD)。カゼインキナーゼII、PKC、PKA/PKGおよびチロシンキナーゼなどのプロテインキナーゼによる推定リン酸化部位を17箇所含んでいた。そのうちの7箇所は、N末端側に集中していた(図１B)。推定膜貫通領域およびシグナル配列は見出されなかった。

【００５０】

IRBITはS-アデノシルホモシステインのアデノシンとホモシステインへの可逆的加水分解を触媒するS-アデノシルホモシステインヒドロラーゼと相同性を有しているため、まず、大腸菌で発現させた組換えIRBITを用いてこの酵素活性を有しているかどうかについて検討した。C末端にHisタグを付したIRBIT（IRBIT-His）およびN末端にGSTタグを付したIRBIT（GST-IRBIT）を精製し、加水分解方向への酵素活性を測定した。図２に示すように、両組換えIRBITは酵素活性を有していなかった。このことから、IRBITはS-アデノシルホモシステインヒドロラーゼ活性を有していないと結論づけられる。S-アデノシルホモシステインヒドロラーゼはその結晶解析および部位特異的変異体を用いた研究(43, 52-56)より、基質との結合およびNAD^+との結合に関与する残基が決定されている。IRBITがS-アデノシルホモシステインヒドロラーゼ活性を示さないのは、S-アデノシルホモシステインヒドロラーゼの基質結合に重要なアミノ酸、例えば54番目のリジン、302番目のフェニルアラニン、353番目のヒスチジンなどが置換されていることによるのではないかと推測される(図１C)。しかしながら、IRBITは、基質特異性を異にする酵素活性を有している可能性も否定できない。

【００５１】

IRBITの組織分布および細胞内局在

IRBITのN末端領域（図１B、枠内）に対する抗体をアフィニティ精製を経て作

製した。該抗体の特異性を調べるために、IRBITのcDNAをCos-7細胞に遺伝子導入して、その細胞溶解液を抗IRBIT抗体によるイムノブロットにより解析した。図３Ａに示すように、抗IRBIT抗体は、約60kDaの位置にあるタンパク質のみを認識した。外来遺伝子から発現させたIRBIT（図３Ａ、レーン１）の分子量はCos-7の内因性タンパク質（図３Ａ、レーン３）と同じであり、上記cDNAが全長IRBITをコードしていることが確認された。抗IRBIT抗体を用いてイムノブロットによりマウスの組織におけるIRBITの発現を調べた。IRBITは普遍的に検出されたが、大脳および小脳で最も発現が強かった（図３Ｂ）。

【００５２】

次いで、マウス小脳を分画してIRBITの細胞内局在を調べた。IRBITは細胞質画分および粗ミクロソーム画分に存在していた（図３Ｃ、レーン２および３）。粗ミクロソーム画分をさらに、膜結合画分（最初にIRBITが単離された画分）、および高塩抽出後粗ミクロソーム画分に分離した。図３Ｃに示すように、粗ミクロソーム画分中のIRBITは高塩濃度バッファーで部分的に抽出された（図３Ｃ、レーン４）。対照的に、小胞体の膜タンパク質であるIP_3R1は、全く抽出されなかった（図３Ｃ、下の図）。これらの結果から、IRBITは細胞質にも存在し、膜にも結合するタンパク質であることが示された。

【００５３】

高塩抽出画分中のIRBITはIP_3R1と結合し、IRBITのN末端領域は結合に必須である

IRBITはマウス小脳の細胞質画分と膜結合画分との両方に存在していた（図３Ｃ）。そこで、これらの画分中のIRBITがin vitroでIP_3R1と相互作用するか否かを、GSTプルダウン法により調べた。マウス小脳の細胞質画分と粗ミクロソーム由来の高塩抽出画分（すなわち膜結合画分）をGST-ELまたはGSTとインキュベートして、これらの組換えタンパク質とIRBITの結合を抗IRBIT抗体でイムノブロットにより解析した。図４Ａに示すように、高塩抽出画分中のIRBITはGST-ELと結合したが、GSTとはしなかった。（図４Ａ、レーン６およびレーン５）。一方、細胞質画分のIRBITはGST－ELとは結合しなかった（図４Ａ、レーン３）。これらの結果は、バッファーの影響または画分中に含まれる他の低分子物質の影響ではないことを、透析によるバッファー交換後に同様の実験を行うことにより確認し

た。したがって、IRBITの翻訳後修飾、例えばリン酸化などにより、IP$_3$受容体との結合が制御されている可能性が考えられる。

【００５４】

次に、リン酸化の影響を調べるために、高塩抽出画分を非特異的ホスファターゼであるアルカリホスファターゼで処理した後、GST-ELまたはGSTと共にインキュベートした。図４Ｂに示すように、高塩抽出画分中のIRBITはホスファターゼ処理後GST－ELとは結合しなかった（図４Ｂ、レーン６）。この結果からIRBITがIP$_3$R1と結合するには、IRBITのリン酸化が必要である可能性が示唆された。無論、他のタンパク質がリン酸化されることによりこれらのタンパク質の相互作用が制御されているという可能性も現時点では否定はできないが、IRBITはアルカリホスファターゼ処理により該相互作用は見られなくなり、リン酸化によっても、IRBITとIP$_3$受容体との相互作用が制御されていると推測される。次に、IP$_3$R1との相互作用に必要なIRBITの領域を特定するために、GFPのタグを付したIRBITの欠失変異体を用いて、GSTプルダウン法を行った。図５Ｂに示すように、GFP-IRBITおよびGFP-IRBIT(1-277)は両方ともGST-ELに効率よく結合した(図５Ｂ、レーン３および６)。GFP-IRBIT(1-104)はGST-ELと結合したが、GFP-IRBIT およびGFP-IRBIT(1-277)の該結合より弱かった(図５Ｂ、レーン７と９をレーン１と３およびレーン４と６と比較)。一方、N末端領域を欠失したGFP-IRBIT(105-530)はGST-ELと結合しなかった(図５Ｂ、レーン１２および１５)。これらの結果から、IRBITのN末端領域がIP$_3$R1との結合には必須であり、コイルドコイル構造を有する約170アミノ酸(105～277)が該結合の安定化に重要であることが示された。

【００５５】

IRBITには潜在的リン酸化部位が17箇所有り、そのうちの７つがIP$_3$受容体との相互作用に必要な上記N末端領域に局在していることからも、リン酸化がIP$_3$受容体との相互作用に関与している可能性が予想される。これから推測すると、IRBITは脱リン酸化された状態で細胞質中に遊離しており、リン酸化された状態のものはIP$_3$受容体との相互作用を介して膜に結合しているという仮説が成り立つ。実証するまでには至っていないが、IRBITとIP$_3$受容体との相互作用がIP$_3$と直接または間接的なリン酸化とにより二元的に制御されているということが考えられ

る。

【００５６】

Cos-7細胞内ではIRBITはIP$_3$R1と共に小胞体上に局在している

IRBITの細胞内局在を調べるために、IRBITとIP$_3$受容体を過剰発現したCos-7細胞で共焦点免疫蛍光顕微鏡分析を行った。IRBITは細胞質に一様に分布していたが、核内では免疫反応性は示されなかった(図６Ａ)。IRBITは、生化学的分画法による実験では、細胞質画分および粗ミクロソーム画分の両方に存在していた(図３Ｃ)ので、膜に結合しているIRBITのみを可視化し、観察することとした。そのために、固定化の前にIRBITとIP$_3$受容体を共発現したCos-7細胞の細胞膜をサポニンにより透過性にして細胞質に存在するIRBITを洗い出した。そうすると、図６Ｂに示すとおり、IRBITは網状のパターンで分布しており(図６Ｂ、左図)、このことから膜結合性IRBITは小胞体上に分布していることが示唆された。IRBITの免疫反応性は、IP$_3$R1と大部分重複した(図６Ｂ、中央の図、および右図)。IP$_3$R1の染色パターンは、サポニンで細胞膜透過性にしたことにより変化しなかった(データは示さず)。IP$_3$R1とGFP-IRBITとを共発現して、GFPの蛍光を見た場合、同様の結果が観察された(図６ＣおよびＤ)。これらの結果より、過剰発現したCos-7においてIRBITは小胞体上のIP$_3$R1と結合することが示唆された。これらの局在が特異的なものであることを確かめるために、N末端領域を欠損しているためにGST-ELと結合しないGFP-IRBIT(105-530)とIP$_3$R1をCos-7細胞に共発現したところ、GFP-IRBITとは異なり、GFP-IRBIT(105-530)は細胞質と核に分布していた(図６Ｅ)。IRBITは核移行シグナルと推定される配列を有していないので、この核への移行の機序については明らかではない。サポニン処理により細胞質に存在するIRBITを洗い出すと、GFP-IRBIT(105-530)は核にのみ存在し、IP$_3$R1との共局在は確認されなかった(図６Ｆ)。この結果は、IRBITのN末端領域がIP$_3$R1への結合に必須であるという生化学的手法による結果(図５Ｂ)と一致する。

【００５７】

IRBITはin vivoでIP$_3$R1と結合する

組織中でのIRBITとIP$_3$R1との結合を確認するため、マウス小脳を用いた免疫共沈降を行った。マウス小脳の粗ミクロソーム画分の界面活性剤抽出物を抗IRBIT

抗体で免疫沈降し、沈降物を抗IP_3R1抗体でイムノブロット解析した。IP_3R1は抗IRBIT抗体で共沈澱したが、コントロール抗体ではしなかった（Fig.　7）。この結果は小脳におけるIRBITとIP_3R1とのin vivoでの結合を示している。

【００５８】

生理的濃度のIP_3により選択的にIP_3R1からIRBITの解離が起こる

IRBITは最初、50 μMのIP_3によるGST-ELカラムからの溶出液中で同定された(図１Ａ)。このことは、IRBITとIP_3R1との相互作用をIP_3が解離させることを示唆する。しかし、IP_3は刺激により上昇した場合でも数μM程度の細胞内濃度であり(50)、上記溶出に用いた50 μMというIP_3の濃度は生理的範囲より高い。したがって、生理的濃度のIP_3により該タンパク質間相互作用が解離するか否かを検討した。

【００５９】

マウス小脳の粗ミクロソームからの高塩抽出画分中のIRBITをGST-ELによりトラップし、これを0.1～10 μMのIP_3、および他のイノシトールポリホスフェートとしてIP_2、IP_4、IP_6または ATPにて溶出を試みた。図８Ａに示すように、IP_3はGST-ELからIRBITを濃度依存的に解離させた(図８Ａ a、下図)。このIP_3溶出液中のGST-ELの存在を確認したが、検出されなかった(図８Ａ a、上図)。長時間露光しても同様であった。EC50(IRBITのGST-ELからの解離が最大量の50%となるIP_3濃度)は、約0.5 μMであった。該濃度はIP_3の生理的濃度の範囲内である(50)（図８Ｂ)。また、他のイノシトールポリホスフェートでは、解離効率はIP_3の50分の1程度であり、ATPは10 μMの濃度でも解離させなかった。したがって、生理的濃度のIP_3により選択的に、IP_3R1からIRBITが解離することが示された。

【００６０】

IRBITはIP_3R1のIP_3結合領域と結合し、かつIP_3R1のLys-508はIRBITとIP_3の両方の結合にとって必須である

IP_3R1のIP_3結合領域または制御領域のいずれの領域がIRBITとの相互作用に必須であるかを調べるために、IP_3R1のドメイン構造(51)に基づいてGST融合タンパク質として構築した8種のIP_3R1の欠失変異体を用いた(Fig.　９Ａ)。図９Ｂに示すように、IP_3結合コア領域(アミノ酸226～576)(11)を含有するGST-IbIIa(アミ

ノ酸226～604)は、GST-ELと同程度にIRBITと結合した。一方、GST-IabおよびGST-IIabなどの他のGST融合タンパク質は、IRBITと結合しなかった。次いで、IRBITとの結合に重要なIP_3R1のアミノ酸残基を特定するために部位特異的突然変異解析を実施した。IP_3R1の508番目のリジン(Lys-508)はIP_3結合に必須なアミノ酸残基であることが判っており(12)、該リジン残基をアラニンに置換したGST-IbIIa(K508A)では、そのIP_3結合親和性が著しく減少することが判っている(42)。一方、GST-IbIIaの441番目のアルギニン残基がグルタミンに置換したR441Qは、IP_3に対する結合親和性がGST-IbIIaより高いことが判っている(42)。これらの組換えタンパク質を用いてプルダウンアッセイを行ったところ、IRBITはGST-IbIIaとR441Qとには同じレベルで結合したが、K508AにはIRBITは結合しなかった(図９Ｃ)。IP_3R1の508番目のリジンがIP_3とのみならずIRBITとの相互作用にも必要であることを示しており、このことからも、IRBITとIP_3R1との結合はIP_3により解離するという結果が支持される。

【００６１】

【発明の効果】

以上の結果を総合すると、IRBITは通常IP_3R1と会合しており、細胞外からの刺激によりIP_3の濃度が上昇するとIP_3R1から解離すると考えられる。IRBITはIP_3によりIP_3受容体との相互作用が制御され得ることが示された、唯一のIP_3受容体結合タンパク質である。

【００６２】

本発明者らが、発見したIRBITタンパク質は、IP_3受容体と結合し、該結合はIP_3によって濃度依存的に解離することから、IRBITは、細胞内およびセルフリーの系のいずれにおいてもIP_3の検出および定量のための指示薬として有用なタンパク質分子であることが示された。また、IRBITのアミノ酸配列の1～104番目までの配列がIP_3への結合に必須な領域であることから、このアミノ酸配列を少なくとも含むタンパク質もIRBITと同様、IP_3の指示薬として有用であると考えられる。

【００６３】

参考文献

1. Berridge, M. J. (1993) Nature 361, 315-325

2. Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2000) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1, 11-21

3. Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1995) J. Neurochem. 64, 953-960

4. Patel, S., Joseph, S. K., and Thomas, A. P. (1999) Cell Calcium 25, 247-264

5. Furuichi, T., Yoshikawa, S., Miyawaki, A., Wada, K., Maeda, N., and Mikoshiba, K. (1989) Nature 342, 32-38

6. Sudhof, T. C., Newton, C. L., Archer, B. T., III, Ushkaryov, U. A., and Mignery, G. A. (1991) EMBO J. 10, 3199-3206

7. Blondel, O., Takeda, J., Janssen, H., Seino, S., and Bell, G. I. (1993) J. Biol. Chem. 268, 11356-11363

8. Worley, P. F., Baraban, J. M., Colvin, J. S., and Snyder, S. H. (1987) Nature 325, 159-161

9. Furuichi, T., Simon-Chazottes, D., Fujino, I., Yamada, N., Hasegawa, M., Miyawaki, A., Yoshikawa, S., Guenet, J.-L., and Mikoshiba, K. (1993) Recept. Channels 1, 11-24

10. Mignery, G. A., and Sudhof, T. C. (1990) EMBO J. 9, 3893-3898

11. Miyawaki, A., Furuichi, T., Ryou, Y., Yoshikawa, S., Nakagawa, T., Saitoh, T., and Mikoshiba, K. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4911-4915

12. Yoshikawa, F., Morita, M., Monkawa, T., Michikawa, T., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1996) J. Biol. Chem. 271, 18277-18284

13. Zhu, C.-C., Furuichi, T., Mikoshiba, K., and Wojcikiewicz, R. J. H. (1999) J. Biol. Chem. 274, 3476-3484

14. Zhu, C.-C., and Wojcikiewicz, R. J. H. (2000) Biochem. J. 348, 551-556

15. Berridge, M. J., Bootman, M. D., and Lipp, P. (1998) Nature 395, 645-648

16. Thrower, E. C., Hagar, R. E., and Ehrlich, B. E. (2001) Trends Pharmacol. Sci. 22, 580-586

17. Mackrill, J. J. (1999) Biochem. J. 337, 345-361

18. Patel, S., Morris, S. A., Adkins, C. E., O'beirne, G., and Taylor, C. W. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 11627-11632

19. Michikawa, T., Hirota, J., Kawano, S., Hiraoka, M., Yamada, M., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1999) Neuron 23, 799-808

20. Cameron, A. M., Steiner, J. P., Sabatini, D. M., Kaplin, A. I., Walensky, L. D., and Snyder, S. H. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 1784-1788

21. Cameron, A. M., Nucifora, F. C., Jr, Fung, E. T., Livingston, D. J., Aldape, R. A., Ross, C. A., and Snyder, S. H. (1997) J. Biol. Chem. 272, 27582-27588

22. Dargan, S. L., Lea, E. J. A., and Dawson, A. P. (2002) Biochem. J. 361, 401-407

23. Bultynck, G., De Smet, P., Weidema, A. F., Ver Heyen, M., Maes, K., Callewaert, G., Missiaen, L., Parys, J. B., and De Smedt, H. (2000) J. Physiol. 525, 681-693

24. Bultynck, G., De Smet, P., Rossi, D., Callewaert, G., Missiaen, L., Sorrentino, V., De Smedt, H., and Parys, J. B. (2001) Biochem. J. 354, 413-422

25. Cameron, A. M., Steiner, J. P., Roskams, A. J., Ali, S. M., Ronnett, G. V., and Snyder, S. H. (1995) Cell 83, 463-472

26. Joseph, S. K., and Samanta, S. (1993) J. Biol. Chem. 268, 6477-6486

27. Bourguignon, L. Y. W., Jin, H., Iida, N., Brandt, N. R., and Zhang, S. H. (1993) J. Biol. Chem. 268, 7290-7297

28. Hayashi, T., and Su, T.-P. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 491-496

29. Yoo, S. H., So, S. H., Kweon, H. S., Lee, J. S., Kang, M. K., and Jeon, C. J. (2000) J. Biol. Chem. 275, 12553-12559

30. Yoo, S. H., and Jeon, C. J. (2000) J. Biol. Chem. 275, 15067-15073

31. Thrower, E. C., Park, H. Y., So, S. H., Yoo, S. H., and Ehrlich, B. E. (2002) J. Biol. Chem. 277, 15801-15806

32. Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G.-X., Allescher, H.-D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F., and Ruth, P. (2000) Nature 404, 197-201

33. Jayaraman, T., Ondrias, K., Ondiasova, E., and Marks, A. R. (1996) Science 272, 1492-1494

34. Yokoyama, K., Su, I., Tezuka, T., Yasuda, T., Mikoshiba, K., Tarakhovsky, A., and Yamamoto, T. (2002) EMBO J. 21, 83-92

35. Yang, J., McBride, S., Mak, D.-O. D., Vardi, N., Palczewski, K., Haeseleer, F., and Foskett, J. K. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 7711-7716

36. Tu, J. C., Xiao, B., Yuan, J. P., Lanahan, A. A., Leoffert, K., Li, M., Linden, D. J., and Worley, P. F. (1998) Neuron 21, 717-726

37. Delmas, P., Wanaverbecq, N., Abogadie, F. C., Mistry, M., and Brown, D. A. (2002) Neuron 14, 209-220

38. Kiselyov, K., Mignery, G. A., Zhu, M. X., and Muallem, S. (1999) Mol. Cell 4, 423-429

39. Boulay, G., Brown, D. M., Qin, N., Jiang, M., Dietrich, A., Zhu, M. X., Chen, Z., Birnbaumer, M., Mikoshiba, K., and Birnbaumer, L. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 14955-14960

40. Guan, K., and Dixon, J. E. (1991) Anal. Biochem. 192, 262-267

41. Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J. C., and Ferrara, P. (1992) Anal. Biochem. 203, 173-179

42. Uchiyama, T., Yoshikawa, F., Hishida, A., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (2002) J. Biol. Chem. 277, 8106-8113

43. Yuan, C.-S., Ault-Riche, D. B., and Borchardt, R. T. (1996) J. Biol. Chem. 271, 28009-28016

44. Miyawaki, A., Furuichi, T., Maeda. N., and Mikoshiba, K. (1990) Neuron 5, 11-18

45. Maeda, N., Niinobe, M., Nakahira, K., and Mikoshiba, K. (1988) J. Neurochem. 51, 1724-1730

46. Maeda, N., Niinobe, M., Inoue, Y., and Mikoshiba, K. (1989) Dev. Biol. 133, 67-76

47. Sugiyama, T., Furuya, A., Monkawa, T., Yamamoto-Hino, M., Satoh, S., Ohmori, K., Miyawaki, A., Hanai, N., Mikoshiba, K., and Hasegawa, M. (1994) FEBS Lett. 354, 149-154

48. Ogawa, H., Gomi, T., Mueckler, M. M., Fujioka, M., Backlund, P. S., Jr., Aksamit, R. R., Unson, C. G., and Cantoni, G. L. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 719-723

49. Dekker, J. W., Budhia, S., Angel, N. Z., Cooper, B. J., Clark, G. J., Hart, D. N. J., and Kato, M. (2002) Immunogenetics 53, 993-1001

50. Luzzi, V., Sims, C. E., Soughayer, J. S., and Allbritton, N. L. (1998) J. Biol. Chem. 273, 28657-28662

51. Yoshikawa, F., Iwasaki, H., Michikawa, T., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1999) J. Biol. Chem. 274, 316-327

52. Turner, M. A., Yuan, C.-S., Borchardt, R. T., Hershfield, M. S., Smith, G. D., and Howell, P. L. (1998) Nat. struct. Biol. 5, 369-376

53. Hu, Y., Komoto, J., Huang, Y., Gomi, T., Ogawa, H., Takata, Y., Fujioka, M., and Takusagawa, F. (1999) Biochemistry 38, 8323-8333

54. Gomi. T., Takata, Y., Date, T., Fujioka, M., Aksamit, R. R., Backlund, P. S., Jr., and Cantoni, G. L. (1990) J. Biol. Chem. 265, 16102-16107

55. Aksamit, R. R., Backlund, P. S., Jr., Moos, M., Jr., Caryk, T., Gomi, T., Ogawa, H., Fujioka, M., and Cantoni, G. L. (1994) J. Biol. Chem.

269, 4084-4091

56. Ault-Riche, D. B., Yuan, C.-S., and Borchardt, R. T. (1994) J. Biol. Chem. 269, 31472-31478

57. Ichtchenko, K., Hata, Y., Nguyen, T., Ullrich, B., Missler, M., Moomaw, C., and Sudhof, T. C. (1995) Cell 81, 435-443

58. Peles, E., Nativ, M., Campbell, P. L., Sakurai, T., Martinez, R., Lev, S., Clary, D. O., Schilling, J., Barnea, G., Plowman, G. D., Grumet, M., and Schlessinger, J. (1995) Cell 82, 251-260

59. Peifer, M., Berg, S., and Reynolds, A. B. (1994) Cell 76, 789-791

60. Supattapone, S., Worley, P. F., Baraban, J. M., and Snyder, S. H. (1988) J. Biol. Chem. 263, 1530-1534

61. Maeda, N., Niinobe, M., and Mikoshiba, K. (1990) EMBO J. 9, 61-67

62. Worley, P. F., Baraban, J. M., Supattapone, S., Wilson, V. S., and Snyder, S. H. (1987) J. Biol. Chem. 262, 12132-12136

63. Hannaert-Merah, Z., Coquil, J. F., Combettes, L., Claret, M., Mauger, J. P., and Champeil, P. (1994) J. Biol. Chem. 269, 29642-29649

64. Natsume, T., Hirota, J., Yoshikawa, F., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1999) Biochem. Biophys. Res. Com. 260, 527-533

65. Yoshikawa, F., Uchiyama, T., Iwasaki, H., Tomomori-Satoh, C., Tanaka, T., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1999) Biochem. Biophys. Res. Com. 257, 792-797

66. Wojcikiewicz, R. J. H., Furuichi, T., Nakade, S., Mikoshiba, K., and Nahorski, S. R. (1994) J. Biol. Chem. 269, 7963-7969

67. Wojcikiewicz, R. J. H. (1995) J. Biol. Chem. 270, 11678-11683

68. Bokkala, S., and Joseph, S. K. (1997) J. Biol. Chem. 272, 12454-12461

69. Oberdorf, J., Webster, J. M., Zhu, C. C., Luo, S. G., and Wojcikiewicz, R. J. H. (1999) Biochem. J. 339, 453-461

70. Pollok, B. A., and Heim, R. (1999) Trends Cell Biol. 9, 57-60

71. Adams, S. R., Harootunian, A. T., Buechler, Y. J., Taylor, S. S., and Tsien, R. Y. (1991) Nature 349, 694-697

72. Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., Ikura, M., and Tsien, R. Y. (1997) Nature 388, 882-887

73. Hirose, K., Kadowaki, S., Tanabe, M., Takeshima, H., and Iino, M. (1999) Science 284, 1527-1530

【００６４】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> A novel inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) receptor binding protein and an IP_3 indicator

<130> RJH14-130N

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 530
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 1

```
Met Ser Met Pro Asp Ala Met Pro Leu Pro Gly Val Gly Glu Glu Leu
  1               5                  10                  15
```

```
Lys Gln Ala Lys Glu Ile Glu Asp Ala Glu Lys Tyr Ser Phe Met Ala
            20                  25                  30

Thr Val Thr Lys Ala Pro Lys Lys Gln Ile Gln Phe Ala Asp Asp Met
        35                  40                  45

Gln Glu Phe Thr Lys Phe Pro Thr Lys Thr Gly Arg Arg Ser Leu Ser
    50                  55                  60

Arg Ser Ile Ser Gln Ser Ser Thr Asp Ser Tyr Ser Ser Ala Ala Ser
65                  70                  75                  80

Tyr Thr Asp Ser Ser Asp Asp Glu Val Ser Pro Arg Glu Lys Gln Gln
                85                  90                  95

Thr Asn Ser Lys Gly Ser Ser Asn Phe Cys Val Lys Asn Ile Lys Gln
            100                 105                 110

Ala Glu Phe Gly Arg Arg Glu Ile Glu Ile Ala Glu Gln Asp Met Ser
        115                 120                 125

Ala Leu Ile Ser Leu Arg Lys Arg Ala Gln Gly Glu Lys Pro Leu Ala
    130                 135                 140

Gly Ala Lys Ile Val Gly Cys Thr His Ile Thr Ala Gln Thr Ala Val
145                 150                 155                 160

Leu Ile Glu Thr Leu Cys Ala Leu Gly Ala Gln Cys Arg Trp Ser Ala
```

165 170 175

Cys Asn Ile Tyr Ser Thr Gln Asn Glu Val Ala Ala Ala Leu Ala Glu

180 185 190

Ala Gly Val Ala Val Phe Ala Trp Lys Gly Glu Ser Glu Asp Asp Phe

195 200 205

Trp Trp Cys Ile Asp Arg Cys Val Asn Met Asp Gly Trp Gln Ala Asn

210 215 220

Met Ile Leu Asp Asp Gly Gly Asp Leu Thr His Trp Val Tyr Lys Lys

225 230 235 240

Tyr Pro Asn Val Phe Lys Lys Ile Arg Gly Ile Val Glu Glu Ser Val

245 250 255

Thr Gly Val His Arg Leu Tyr Gln Leu Ser Lys Ala Gly Lys Leu Cys

260 265 270

Val Pro Ala Met Asn Val Asn Asp Ser Val Thr Lys Gln Lys Phe Asp

275 280 285

Asn Leu Tyr Cys Cys Arg Glu Ser Ile Leu Asp Gly Leu Lys Arg Thr

290 295 300

Thr Asp Val Met Phe Gly Gly Lys Gln Val Val Val Cys Gly Tyr Gly

305 310 315 320

Glu Val Gly Lys Gly Cys Cys Ala Ala Leu Lys Ala Leu Gly Ala Ile
325 330 335

Val Tyr Ile Thr Glu Ile Asp Pro Ile Cys Ala Leu Gln Ala Cys Met
340 345 350

Asp Gly Phe Arg Val Val Lys Leu Asn Glu Val Ile Arg Gln Val Asp
355 360 365

Val Val Ile Thr Cys Thr Gly Asn Lys Asn Val Val Thr Arg Glu His
370 375 380

Leu Asp Arg Met Lys Asn Ser Cys Ile Val Cys Asn Met Gly His Ser
385 390 395 400

Asn Thr Glu Ile Asp Val Thr Ser Leu Arg Thr Pro Glu Leu Thr Trp
405 410 415

Glu Arg Val Arg Ser Gln Val Asp His Val Ile Trp Pro Asp Gly Lys
420 425 430

Arg Val Val Leu Leu Ala Glu Gly Arg Leu Leu Asn Leu Ser Cys Ser
435 440 445

Thr Val Pro Thr Phe Val Leu Ser Ile Thr Ala Thr Thr Gln Ala Leu
450 455 460

Ala Leu Ile Glu Leu Tyr Asn Ala Pro Glu Gly Arg Tyr Lys Gln Asp
465 470 475 480

Val Tyr Leu Leu Pro Lys Lys Met Asp Glu Tyr Val Ala Ser Leu His

485 490 495

Leu Pro Ser Phe Asp Ala His Leu Thr Glu Leu Thr Asp Asp Gln Ala

500 505 510

Lys Tyr Leu Gly Leu Asn Lys Asn Gly Pro Phe Lys Pro Asn Tyr Tyr

515 520 525

Arg Tyr

530

<210> 2

<211> 1593

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

atgtcgatgc ctgacgcgat gccgctgccc ggtgtcgggg aggagctgaa acaggccaag 60

gagatcgagg acgccgagaa gtactccttc atggccacgg tcaccaaggc tcccaagaag 120

caaatccagt ttgctgatga catgcaagag ttcaccaaat tccctactaa gactggccgg 180

agatctttgt ctcgttccat ctcacaatcc tccacagaca gctacagttc agctgcatcc 240

tatacagata gctctgatga tgaggtttcc cctcgagaga agcagcaaac caactcgaag 300

ggcagcagca atttctgtgt gaagaacatc aagcaggcag agtttggacg ccgggagatt 360

gagattgcag agcaagacat gtctgctctg atttcactca ggaaacgtgc tcagggagag 420

aagcctttgg ctggtgctaa aatagtgggc tgtacgcaca tcacggccca gacagcggta 480

ttaattgaga ccctttgtgc cctgggagct cagtgccgct ggtctgcctg caacatctat 540 tcaactcaga atgaagtagc tgcagcactg gctgaggctg gagtcgcggt gtttgcttgg 600

aagggcgagt cagaagatga tttctggtgg tgcattgacc gctgtgtcaa catggatggg 660

tggcaggcta acatgatcct ggatgatggg ggagacttaa cccactgggt ttataagaag 720

tatccaaacg tgtttaagaa gatccgaggc attgtggaag agagcgtgac tggtgttcac 780

aggctgtatc agctctccaa agctgggaag ctctgtgttc cagccatgaa tgtcaatgat 840

tctgttacca aacagaagtt tgataacctg tactgctgcc gagaatccat tttggatggc 900

ctgaagagga ccacggatgt gatgtttggt gggaaacagg tggtggtgtg tggctatggt 960

gaggtaggaa agggctgctg tgctgctctc aaggcccttg gagcaattgt ctacataaca 1020

gaaattgacc ccatctgtgc tctgcaggcc tgcatggatg ggttcagggt ggtgaagctg 1080

aatgaagtca tccggcaggt ggacgttgta attacttgca caggaaataa gaatgtagtg 1140

actcgggagc acttggaccg aatgaaaaat agttgtattg tgtgcaatat gggccattcc 1200

aacacggaga tcgacgtgac cagcctccgc actccagaac taacatggga gcgtgtacgt 1260

tctcaggtgg accatgtcat ctggcctgat ggcaaacggg tcgtccttct agcagagggc 1320

cgtttactta atctgagctg ctccacagtc cctacctttg ttctttccat cacggctaca 1380

acacaggctt tggcactgat agagctttac aacgccccgg agggacgcta caaacaggat 1440

gtgtacttgc ttcctaagaa gatggatgaa tatgttgcca gcttgcactt accatcattt 1500

gatgcccacc tgacagaact gacagatgac caagcaaagt atctgggact caacaaaaat 1560

gggccattca aacctaatta ttacagatac taa 1593

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Tyr Ser Phe Met Ala Thr Val Thr Lys

1 5

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Gln Ile Gln Phe Ala Asp Asp Met Gln Glu Phe Thr Lys
  1   5   10

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a primer for mouse IRBIT

<400> 5

atgtcgatgc ctgacgcgat gc   22

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a primer for mouse IRBIT

<400> 6
gcgtggttca tgtggactgg tc 22

<210> 7
<211> 2749
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 7
Met Ser Asp Lys Met Ser Ser Phe Leu His Ile Gly Asp Ile Cys Ser
1 5 10 15

Leu Tyr Ala Glu Gly Ser Thr Asn Gly Phe Ile Ser Thr Leu Gly Leu
20 25 30

Val Asp Asp Arg Cys Val Val Gln Pro Glu Ala Gly Asp Leu Asn Asn
35 40 45

Pro Pro Lys Lys Phe Arg Asp Cys Leu Phe Lys Leu Cys Pro Met Asn
50 55 60

Arg Tyr Ser Ala Gln Lys Gln Phe Trp Lys Ala Ala Lys Pro Gly Ala
65 70 75 80

Asn Ser Thr Thr Asp Ala Val Leu Leu Asn Lys Leu His His Ala Ala
85 90 95

```
Asp Leu Glu Lys Lys Gln Asn Glu Thr Glu Asn Arg Lys Leu Leu Gly
            100                 105                 110

Thr Val Ile Gln Tyr Gly Asn Val Ile Gln Leu Leu His Leu Lys Ser
        115                 120                 125

Asn Lys Tyr Leu Thr Val Asn Lys Arg Leu Pro Ala Leu Leu Glu Lys
    130                 135                 140

Asn Ala Met Arg Val Thr Leu Asp Glu Ala Gly Asn Glu Gly Ser Trp
145                 150                 155                 160

Phe Tyr Ile Gln Pro Phe Tyr Lys Leu Arg Ser Ile Gly Asp Ser Val
                165                 170                 175

Val Ile Gly Asp Lys Val Val Leu Asn Pro Val Asn Ala Gly Gln Pro
            180                 185                 190

Leu His Ala Ser Ser His Gln Leu Val Asp Asn Pro Gly Cys Asn Glu
        195                 200                 205

Val Asn Ser Val Asn Cys Asn Thr Ser Trp Lys Ile Val Leu Phe Met
    210                 215                 220

Lys Trp Ser Asp Asn Lys Asp Asp Ile Leu Lys Gly Gly Asp Val Val
225                 230                 235                 240

Arg Leu Phe His Ala Glu Gln Glu Lys Phe Leu Thr Cys Asp Glu His
```

245 250 255

Arg Lys Lys Gln His Val Phe Leu Arg Thr Thr Gly Arg Gln Ser Ala

260 265 270

Thr Ser Ala Thr Ser Ser Lys Ala Leu Trp Glu Val Glu Val Val Gln

275 280 285

His Asp Pro Cys Arg Gly Gly Ala Gly Tyr Trp Asn Ser Leu Phe Arg

290 295 300

Phe Lys His Leu Ala Thr Gly His Tyr Leu Ala Ala Glu Val Asp Pro

305 310 315 320

Asp Phe Glu Glu Glu Cys Leu Glu Phe Gln Pro Ser Val Asp Pro Asp

325 330 335

Gln Asp Ala Ser Arg Ser Arg Leu Arg Asn Ala Gln Glu Lys Met Val

340 345 350

Tyr Ser Leu Val Ser Val Pro Glu Gly Asn Asp Ile Ser Ser Ile Phe

355 360 365

Glu Leu Asp Pro Thr Thr Leu Arg Gly Gly Asp Ser Leu Val Pro Arg

370 375 380

Asn Ser Tyr Val Arg Leu Arg His Leu Cys Thr Asn Thr Trp Val His

385 390 395 400

Ser Thr Asn Ile Pro Ile Asp Lys Glu Glu Glu Lys Pro Val Met Leu
405 410 415

Lys Ile Gly Thr Ser Pro Leu Lys Glu Asp Lys Glu Ala Phe Ala Ile
420 425 430

Val Pro Val Ser Pro Ala Glu Val Arg Asp Leu Asp Phe Ala Asn Asp
435 440 445

Ala Ser Lys Val Leu Gly Ser Ile Ala Gly Lys Leu Glu Lys Gly Thr
450 455 460

Ile Thr Gln Asn Glu Arg Arg Ser Val Thr Lys Leu Leu Glu Asp Leu
465 470 475 480

Val Tyr Phe Val Thr Gly Gly Thr Asn Ser Gly Gln Asp Val Leu Glu
485 490 495

Val Val Phe Ser Lys Pro Asn Arg Glu Arg Gln Lys Leu Met Arg Glu
500 505 510

Gln Asn Ile Leu Lys Gln Ile Phe Lys Leu Leu Gln Ala Pro Phe Thr
515 520 525

Asp Cys Gly Asp Gly Pro Met Leu Arg Leu Glu Glu Leu Gly Asp Gln
530 535 540

Arg His Ala Pro Phe Arg His Ile Cys Arg Leu Cys Tyr Arg Val Leu
545 550 555 560

Arg His Ser Gln Gln Asp Tyr Arg Lys Asn Gln Glu Tyr Ile Ala Lys
565 570 575

Gln Phe Gly Phe Met Gln Lys Gln Ile Gly Tyr Asp Val Leu Ala Glu
580 585 590

Asp Thr Ile Thr Ala Leu Leu His Asn Asn Arg Lys Leu Leu Glu Lys
595 600 605

His Ile Thr Ala Ala Glu Ile Asp Thr Phe Val Ser Leu Val Arg Lys
610 615 620

Asn Arg Glu Pro Arg Phe Leu Asp Tyr Leu Ser Asp Leu Cys Val Ser
625 630 635 640

Met Asn Lys Ser Ile Pro Val Thr Gln Glu Leu Ile Cys Lys Ala Val
645 650 655

Leu Asn Pro Thr Asn Ala Asp Ile Leu Ile Glu Thr Lys Leu Val Leu
660 665 670

Ser Arg Phe Glu Phe Glu Gly Val Ser Thr Gly Glu Asn Ala Leu Glu
675 680 685

Ala Gly Glu Asp Glu Glu Glu Val Trp Leu Phe Trp Arg Asp Ser Asn
690 695 700

Lys Glu Ile Arg Ser Lys Ser Val Arg Glu Leu Ala Gln Asp Ala Lys

705 710 715 720

Glu Gly Gln Lys Glu Asp Arg Asp Ile Leu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Gln

725 730 735

Leu Asn Leu Phe Ala Arg Met Cys Leu Asp Arg Gln Tyr Leu Ala Ile

740 745 750

Asn Glu Ile Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Leu Ile Leu Arg Cys Met

755 760 765

Ser Asp Glu Asn Leu Pro Tyr Asp Leu Arg Ala Ser Phe Cys Arg Leu

770 775 780

Met Leu His Met His Val Asp Arg Asp Pro Gln Glu Gln Val Thr Pro

785 790 795 800

Val Lys Tyr Ala Arg Leu Trp Ser Glu Ile Pro Ser Glu Ile Ala Ile

805 810 815

Asp Asp Tyr Asp Ser Ser Gly Thr Ser Lys Asp Glu Ile Lys Glu Arg

820 825 830

Phe Ala Gln Thr Met Glu Phe Val Glu Glu Tyr Leu Arg Asp Val Val

835 840 845

Cys Gln Arg Phe Pro Phe Ser Asp Lys Glu Lys Asn Lys Leu Thr Phe

850 855 860

```
Glu Val Val Asn Leu Ala Arg Asn Leu Ile Tyr Phe Gly Phe Tyr Asn
865                 870                 875                 880

Phe Ser Asp Leu Leu Arg Leu Thr Lys Ile Leu Leu Ala Ile Leu Asp
                885                 890                 895

Cys Val His Val Thr Thr Ile Phe Pro Ile Ser Lys Met Thr Lys Gly
            900                 905                 910

Glu Glu Asn Lys Gly Ser Asn Val Met Arg Ser Ile His Gly Val Gly
        915                 920                 925

Glu Leu Met Thr Gln Val Val Leu Arg Gly Gly Gly Phe Leu Pro Met
    930                 935                 940

Thr Pro Met Ala Ala Ala Pro Glu Gly Asn Val Lys Gln Ala Glu Pro
945                 950                 955                 960

Glu Lys Glu Asp Ile Met Val Met Asp Thr Lys Leu Lys Ile Ile Glu
                965                 970                 975

Ile Leu Gln Phe Ile Leu Asn Val Arg Leu Asp Tyr Arg Ile Ser Cys
            980                 985                 990

Leu Leu Cys Ile Phe Lys Arg Glu Phe Asp Glu Ser Asn Ser Gln Ser
        995                1000                1005

Ser Glu Thr Ser Ser Gly Asn Ser Ser Gln Glu Gly Pro Ser Asn Val
   1010                1015                1020
```

Pro Gly Ala Leu Asp Phe Glu His Ile Glu Glu Gln Ala Glu Gly Ile
1025 1030 1035 1040

Phe Gly Gly Ser Glu Glu Asn Thr Pro Leu Asp Leu Asp Asp His Gly
1045 1050 1055

Gly Arg Thr Phe Leu Arg Val Leu Leu His Leu Thr Met His Asp Tyr
1060 1065 1070

Pro Pro Leu Val Ser Gly Ala Leu Gln Leu Leu Phe Arg His Phe Ser
1075 1080 1085

Gln Arg Gln Glu Val Leu Gln Ala Phe Lys Gln Val Gln Leu Leu Val
1090 1095 1100

Thr Ser Gln Asp Val Asp Asn Tyr Lys Gln Ile Lys Gln Asp Leu Asp
1105 1110 1115 1120

Gln Leu Arg Ser Ile Val Glu Lys Ser Glu Leu Trp Val Tyr Lys Gly
1125 1130 1135

Gln Gly Pro Asp Glu Pro Met Asp Gly Ala Ser Gly Glu Asn Glu His
1140 1145 1150

Lys Lys Thr Glu Glu Gly Thr Ser Lys Pro Leu Lys His Glu Ser Thr
1155 1160 1165

Ser Ser Tyr Asn Tyr Arg Val Val Lys Glu Ile Leu Ile Arg Leu Ser

1170 1175 1180

Lys Leu Cys Val Gln Glu Ser Ala Ser Val Arg Lys Ser Arg Lys Gln
1185 1190 1195 1200

Gln Gln Arg Leu Leu Arg Asn Met Gly Ala His Ala Val Val Leu Glu
1205 1210 1215

Leu Leu Gln Ile Pro Tyr Glu Lys Ala Glu Asp Thr Lys Met Gln Glu
1220 1225 1230

Ile Met Arg Leu Ala His Glu Phe Leu Gln Asn Phe Cys Ala Gly Asn
1235 1240 1245

Gln Gln Asn Gln Ala Leu Leu His Lys His Ile Asn Leu Phe Leu Lys
1250 1255 1260

Pro Gly Ile Leu Glu Ala Val Thr Met Gln His Ile Phe Met Asn Asn
1265 1270 1275 1280

Phe Gln Leu Cys Ser Glu Ile Asn Glu Arg Val Val Gln His Phe Val
1285 1290 1295

His Cys Ile Glu Thr His Gly Arg Asn Val Gln Tyr Ile Lys Phe Leu
1300 1305 1310

Gln Thr Ile Val Lys Ala Glu Gly Lys Phe Ile Lys Lys Cys Gln Asp
1315 1320 1325

Met Val Met Ala Glu Leu Val Asn Ser Gly Glu Asp Val Leu Val Phe
1330 1335 1340

Tyr Asn Asp Arg Ala Ser Phe Gln Thr Leu Ile Gln Met Met Arg Ser
1345 1350 1355 1360

Glu Arg Asp Arg Met Asp Glu Asn Ser Pro Leu Met Tyr His Ile His
1365 1370 1375

Leu Val Glu Leu Leu Ala Val Cys Thr Glu Gly Lys Asn Val Tyr Thr
1380 1385 1390

Glu Ile Lys Cys Asn Ser Leu Leu Pro Leu Asp Asp Ile Val Arg Val
1395 1400 1405

Val Thr His Glu Asp Cys Ile Pro Glu Val Lys Ile Ala Tyr Ile Asn
1410 1415 1420

Phe Leu Asn His Cys Tyr Val Asp Thr Glu Val Glu Met Lys Glu Ile
1425 1430 1435 1440

Tyr Thr Ser Asn His Met Trp Lys Leu Phe Glu Asn Phe Leu Val Asp
1445 1450 1455

Ile Cys Arg Ala Cys Asn Asn Thr Ser Asp Arg Lys His Ala Asp Ser
1460 1465 1470

Ile Leu Glu Lys Tyr Val Thr Glu Ile Val Met Ser Ile Val Thr Thr
1475 1480 1485

Phe Phe Ser Ser Pro Phe Ser Asp Gln Ser Thr Thr Leu Gln Thr Arg
1490 1495 1500

Gln Pro Val Phe Val Gln Leu Leu Gln Gly Val Phe Arg Val Tyr His
1505 1510 1515 1520

Cys Asn Trp Leu Met Pro Ser Gln Lys Ala Ser Val Glu Ser Cys Ile
1525 1530 1535

Arg Val Leu Ser Asp Val Ala Lys Ser Arg Ala Ile Ala Ile Pro Val
1540 1545 1550

Asp Leu Asp Ser Gln Val Asn Asn Leu Phe Leu Lys Ser His Asn Ile
1555 1560 1565

Val Gln Lys Thr Ala Leu Asn Trp Arg Leu Ser Ala Arg Asn Ala Ala
1570 1575 1580

Arg Arg Asp Ser Val Leu Ala Ala Ser Arg Asp Tyr Arg Asn Ile Ile
1585 1590 1595 1600

Glu Arg Leu Gln Asp Ile Val Ser Ala Leu Glu Asp Arg Leu Arg Pro
1605 1610 1615

Leu Val Gln Ala Glu Leu Ser Val Leu Val Asp Val Leu His Arg Pro
1620 1625 1630

Glu Leu Leu Phe Pro Glu Asn Thr Asp Ala Arg Arg Lys Cys Glu Ser

1635 1640 1645

Gly Gly Phe Ile Cys Lys Leu Ile Lys His Thr Lys Gln Leu Leu Glu
1650 1655 1660

Glu Asn Glu Glu Lys Leu Cys Ile Lys Val Leu Gln Thr Leu Arg Glu
1665 1670 1675 1680

Met Met Thr Lys Asp Arg Gly Tyr Gly Glu Lys Gln Ile Ser Ile Asp
1685 1690 1695

Glu Ser Glu Asn Ala Glu Leu Pro Gln Ala Pro Glu Ala Glu Asn Ser
1700 1705 1710

Thr Glu Gln Glu Leu Glu Pro Ser Pro Pro Leu Arg Gln Leu Glu Asp
1715 1720 1725

His Lys Arg Gly Glu Ala Leu Arg Gln Ile Leu Val Asn Arg Tyr Tyr
1730 1735 1740

Gly Asn Ile Arg Pro Ser Gly Arg Arg Glu Ser Leu Thr Ser Phe Gly
1745 1750 1755 1760

Asn Gly Pro Leu Ser Pro Gly Gly Pro Ser Lys Pro Gly Gly Gly Gly
1765 1770 1775

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Thr Ser Arg Gly Glu Met Ser Leu Ala
1780 1785 1790

Glu Val Gln Cys His Leu Asp Lys Glu Gly Ala Ser Asn Leu Val Ile
1795 1800 1805

Asp Leu Ile Met Asn Ala Ser Ser Asp Arg Val Phe His Glu Ser Ile
1810 1815 1820

Leu Leu Ala Ile Ala Leu Leu Glu Gly Gly Asn Thr Thr Ile Gln His
1825 1830 1835 1840

Ser Phe Phe Cys Arg Leu Thr Glu Asp Lys Lys Ser Glu Lys Phe Phe
1845 1850 1855

Lys Val Phe Tyr Asp Arg Met Lys Val Ala Gln Gln Glu Ile Lys Ala
1860 1865 1870

Thr Val Thr Val Asn Thr Ser Asp Leu Gly Asn Lys Lys Lys Asp Asp
1875 1880 1885

Glu Val Asp Arg Asp Ala Pro Ser Arg Lys Lys Ala Lys Glu Pro Thr
1890 1895 1900

Thr Gln Ile Thr Glu Glu Val Arg Asp Gln Leu Leu Glu Ala Ser Ala
1905 1910 1915 1920

Ala Thr Arg Lys Ala Phe Thr Thr Phe Arg Arg Glu Ala Asp Pro Asp
1925 1930 1935

Asp His Tyr Gln Ser Gly Glu Gly Thr Gln Ala Thr Thr Asp Lys Ala
1940 1945 1950

Lys Asp Asp Leu Glu Met Ser Ala Val Ile Thr Ile Met Gln Pro Ile
1955 1960 1965

Leu Arg Phe Leu Gln Leu Leu Cys Glu Asn His Asn Arg Asp Leu Gln
1970 1975 1980

Asn Phe Leu Arg Cys Gln Asn Asn Lys Thr Asn Tyr Asn Leu Val Cys
1985 1990 1995 2000

Glu Thr Leu Gln Phe Leu Asp Cys Ile Cys Gly Ser Thr Thr Gly Gly
2005 2010 2015

Leu Gly Leu Leu Gly Leu Tyr Ile Asn Glu Lys Asn Val Ala Leu Ile
2020 2025 2030

Asn Gln Thr Leu Glu Ser Leu Thr Glu Tyr Cys Gln Gly Pro Cys His
2035 2040 2045

Glu Asn Gln Asn Cys Ile Ala Thr His Glu Ser Asn Gly Ile Asp Ile
2050 2055 2060

Ile Thr Ala Leu Ile Leu Asn Asp Ile Asn Pro Leu Gly Lys Lys Arg
2065 2070 2075 2080

Met Asp Leu Val Leu Glu Leu Lys Asn Asn Ala Ser Lys Leu Leu Leu
2085 2090 2095

Ala Ile Met Glu Ser Arg His Asp Ser Glu Asn Ala Glu Arg Ile Leu

2100 2105 2110

Tyr Asn Met Arg Pro Lys Glu Leu Val Glu Val Ile Lys Lys Ala Tyr
2115 2120 2125

Met Gln Gly Glu Val Glu Phe Glu Asp Gly Glu Asn Gly Glu Asp Gly
2130 2135 2140

Ala Ala Ser Pro Arg Asn Val Gly His Asn Ile Tyr Ile Leu Ala His
2145 2150 2155 2160

Gln Leu Ala Arg His Asn Lys Glu Leu Gln Thr Met Leu Lys Pro Gly
2165 2170 2175

Gly Gln Val Asp Gly Asp Glu Ala Leu Glu Phe Tyr Ala Lys His Thr
2180 2185 2190

Ala Gln Ile Glu Ile Val Arg Leu Asp Arg Thr Met Glu Gln Ile Val
2195 2200 2205

Phe Pro Val Pro Ser Ile Cys Glu Phe Leu Thr Lys Glu Ser Lys Leu
2210 2215 2220

Arg Ile Tyr Tyr Thr Thr Glu Arg Asp Glu Gln Gly Ser Lys Ile Asn
2225 2230 2235 2240

Asp Phe Phe Leu Arg Ser Glu Asp Leu Phe Asn Glu Met Asn Trp Gln
2245 2250 2255

Lys Lys Leu Arg Ala Gln Pro Val Leu Tyr Trp Cys Ala Arg Asn Met
2260 2265 2270

Ser Phe Trp Ser Ser Ile Ser Phe Asn Leu Ala Val Leu Met Asn Leu
2275 2280 2285

Leu Val Ala Phe Phe Tyr Pro Phe Lys Gly Val Arg Gly Gly Thr Leu
2290 2295 2300

Glu Pro His Trp Ser Gly Leu Leu Trp Thr Ala Met Leu Ile Ser Leu
2305 2310 2315 2320

Ala Ile Val Ile Ala Leu Pro Lys Pro His Gly Ile Arg Ala Leu Ile
2325 2330 2335

Ala Ser Thr Ile Leu Arg Leu Ile Phe Ser Val Gly Leu Gln Pro Thr
2340 2345 2350

Leu Phe Leu Leu Gly Ala Phe Asn Val Cys Asn Lys Ile Ile Phe Leu
2355 2360 2365

Met Ser Phe Val Gly Asn Cys Gly Thr Phe Thr Arg Gly Tyr Arg Ala
2370 2375 2380

Met Val Leu Asp Val Glu Phe Leu Tyr His Leu Leu Tyr Leu Leu Ile
2385 2390 2395 2400

Cys Ala Met Gly Leu Phe Val His Glu Phe Phe Tyr Ser Leu Leu Leu
2405 2410 2415

```
Phe Asp Leu Val Tyr Arg Glu Glu Thr Leu Leu Asn Val Ile Lys Ser
            2420                2425                2430

Val Thr Arg Asn Gly Arg Ser Ile Ile Leu Thr Ala Val Leu Ala Leu
        2435                2440                2445

Ile Leu Val Tyr Leu Phe Ser Ile Val Gly Tyr Leu Phe Phe Lys Asp
    2450                2455                2460

Asp Phe Ile Leu Glu Val Asp Arg Leu Pro Asn Glu Thr Ala Val Pro
2465                2470                2475                2480

Glu Thr Gly Glu Ser Leu Ala Asn Asp Phe Leu Tyr Ser Asp Val Cys
                2485                2490                2495

Arg Val Glu Thr Gly Glu Asn Cys Thr Ser Pro Ala Pro Lys Glu Glu
            2500                2505                2510

Leu Leu Pro Ala Glu Glu Thr Glu Gln Asp Lys Glu His Thr Cys Glu
        2515                2520                2525

Thr Leu Leu Met Cys Ile Val Thr Val Leu Ser His Gly Leu Arg Ser
    2530                2535                2540

Gly Gly Gly Val Gly Asp Val Leu Arg Lys Pro Ser Lys Glu Glu Pro
2545                2550                2555                2560

Leu Phe Ala Ala Arg Val Ile Tyr Asp Leu Leu Phe Phe Met Val
```

2565 2570 2575

Ile Ile Ile Val Leu Asn Leu Ile Phe Gly Val Ile Ile Asp Thr Phe
2580 2585 2590

Ala Asp Leu Arg Ser Glu Lys Gln Lys Lys Glu Glu Ile Leu Lys Thr
2595 2600 2605

Thr Cys Phe Ile Cys Gly Leu Glu Arg Asp Lys Phe Asp Asn Lys Thr
2610 2615 2620

Val Thr Phe Glu Glu His Ile Lys Glu Glu His Asn Met Trp His Tyr
2625 2630 2635 2640

Leu Cys Phe Ile Val Leu Val Lys Val Lys Asp Ser Thr Glu Tyr Thr
2645 2650 2655

Gly Pro Glu Ser Tyr Val Ala Glu Met Ile Arg Glu Arg Asn Leu Asp
2660 2665 2670

Trp Phe Leu Arg Met Arg Ala Met Ser Leu Val Ser Ser Asp Ser Glu
2675 2680 2685

Gly Glu Gln Asn Glu Leu Arg Asn Leu Gln Glu Lys Leu Glu Ser Thr
2690 2695 2700

Met Lys Leu Val Thr Asn Leu Ser Gly Gln Leu Ser Glu Leu Lys Asp
2705 2710 2715 2720

Gln Met Thr Glu Gln Arg Lys Gln Lys Gln Arg Ile Gly Leu Leu Gly
2725 2730 2735

His Pro Pro His Met Asn Val Asn Pro Gln Gln Pro Ala
2740 2745

【図面の簡単な説明】

【図１】

図１は、IRBITの精製とそのcDNAクローニングについて示した図である。

図１Ａは、ラット小脳の粗ミクロソームからの高塩抽出画分よりGST-ELカラムを用いて精製したIRBITタンパク質のSDS-PAGEの結果である（矢印はIRBITの位置を示す）。IRBITは50μMのIP$_3$で溶出された。溶出液を濃縮後、10%ゲル上でSDS-PAGEにより分離し、クマシーブリリアントブルーで染色した。200 kDa以上の位置および100～200 kDaの位置に認められるバンドは、複数種の抗IP$_3$R1抗体で認識されることから、GST-ELが樹脂からわずかに解離して溶出されたものおよびその分解物であると思われる。図１Ｂは、IRBITの推定アミノ酸配列を示す。精製したIRBITを消化して得られた2種のペプチド部分には太い下線を、セリンに富んだ領域は破線の下線を、コイルドコイル領域には2重下線を、NAD$^+$結合部位には細い下線を、それぞれ付している。カゼインキナーゼ、プロテインキナーゼC、プロテインキナーゼA/プロテインキナーゼG、およびチロシンキナーゼによる推定リン酸化部位は、それぞれ、黒丸、白丸、黒四角および白四角で配列上部に記している。N末端領域は、実線で囲んでいる。図１Ｃは、IRBITのC末端領域とS-アデノシルホモシステインヒドロラーゼ(AHCY)(48)との配列アラインメントを表している。*印は同一残基、：印は類似残基を示している。S-アデノシルホモシステインヒドロラーゼの基質結合に関与する残基には黒丸、NAD$^+$結合に関与する残基には白丸をそれぞれ付している。図１Ｄは、IRBITの構造の模式図である。NTRはN末端領域、CTRはC末端領域、SERはセリンに富んだ領域、CCはコイルドコイル領域、およびNADはNAD$^+$結合部位を表す。

【図２】

図２は、IRBITはS-アデノシルホモシステインヒドロラーゼ活性を有していな

いことを示す。

組換えIRBIT-His(白丸)、GST-IRBIT(三角)、GST(四角)およびS-アデノシルホモシステインヒドロラーゼ(黒丸)の加水分解方向へのS-アデノシルホモシステインヒドロラーゼ活性を公知の方法(43)にしたがって測定した。結果は、3回の独立した実験の結果の平均±標準偏差として示す。

【図３】

図３は、IRBITの組織分布および細胞内局在を示す図である。図３Aは、外来性発現させたIRBITと内因性IRBITのウェスタン分析の結果を示す。IRBIT(レーン１)およびモックコントロール(レーン２および３)を遺伝子導入したCos-7細胞の細胞溶解液を抗IRBIT抗体でウェスタンブロッティング分析した。レーン３はレーン１および２に対して10倍量の溶解液を添加した。図３Ｂは、マウス組織のS1フラクション(2 μgタンパク質)を抗IRBIT抗体でウェスタンブロッティング分析することにより、IRBITの組織分布を調べた結果である。図３Ｃは、マウス小脳の細胞内局在を調べた結果である。マウス組織のS1画分を100,000 x gで遠心後、その細胞質画分(レーン２)および粗ミクロソーム画分(レーン３)を得た。さらに、粗ミクロソーム画分を500 mM NaClを含む高塩濃度バッファーで抽出して、100,000 x gで遠心後、膜結合画分(レーン４)と高塩抽出後粗ミクロソーム画分(レーン５)を得た。上図は、各画分(１μgタンパク質)を抗IRBIT抗体によるウェスタンブロッティング分析した結果である。下図は、抗IP_3R1抗体でのウェスタンブロッティング分析の結果である。

【図４】

図４は、高塩抽出画分中のIRBITはIP_3R1とin vitroで相互作用するが、細胞質中のIRBITは相互作用しないことを示す図である。図４Ａは、マウス小脳細胞質画分(レーン１～３)および粗ミクロソームからの高塩抽出画分(レーン４～６)を、GST-EL(レーン３および６)またはGST(レーン２および５)と共にインキュベートし、グルタチオン-セファロースにより結合したタンパク質をプルダウンし、グルタチオンで溶出後、抗IRBIT抗体(上図)でウェスタンブロッティング分析した。グルタチオン-セファロースでプルダウンしたGST-ELおよびGSTは、クマシーブリリアントブルーで染色した(下図)。図４Ｂは、マウス小脳から得た粗ミクロ

ソームの高塩抽出画分を、アルカリホスファターゼ処理なし（レーン１～３）または該処理後（レーン４～６）にて、GST-EL（レーン３および６）またはGST（レーン２および５）と共にインキュベートし、図４Ａと同様にIRBITの結合を分析した結果を示す。

【図５】

図５は、IP$_3$R1との相互作用にはIRBITのN末端領域が必要であることを示す図である。図５Ａは、IRBITとIRBITのGFP融合欠失変異体の構造を模式的に示す。図５Ｂでは、GFP-IRBIT発現Cos-7細胞（レーン1～３）、GFP-IRBIT(1-277)発現Cos-7細胞（レーン４～６）、GFP-IRBIT(1-104)発現Cos-7細胞（レーン７～９）、GFP-IRBIT(105-530)発現Cos-7細胞（レーン１０～１２）およびGFP発現Cos-7細胞（レーン１３～１５）の細胞溶解液をGSTプルダウンアッセイに用いた。各GFP融合タンパク質を発現しているCos-7細胞の溶解液（インプット：I)をGST-EL(E)またはGST(G)とインキュベートした。結合したタンパク質をグルタチオン-セファロースでプルダウンし、グルタチオンで溶出後、抗GFP抗体でイムノブロット解析した。

【図６】

図６は、共発現したCos-7細胞では、IRBITはIP$_3$R1と共局在することを示す図である。IP$_3$R1を、IRBIT（ＡおよびＢ）、GFP-IRBIT（ＣおよびＤ）およびGFP-IRBIT(105-530)（ＥおよびＦ）と共にCos-7細胞に一過性に共発現し、それぞれのタンパク質の細胞内局在を間接的免疫蛍光(抗IP$_3$R1および抗IRBIT抗体にて）と蛍光共焦点顕微鏡法(GFP-IRBITおよびGFP-IRBIT(105-530))により分析した。Ｂ、ＤおよびＦは、細胞を固定化する前に、サポニンで細胞膜透過化して細胞質タンパク質を洗い出した。左列のパネルは、IRBIT（Ｂ）、GFP-IRBIT（Ｄ）およびGFP-IRBIT(105-530)（Ｆ）を示し、中央のパネルは、IP$_3$R1を示す。右列のパネルは、左列および中央のパネルを合わせたものである。Ｂの下列のパネルは、上列のパネルを拡大したものである。スケールは10 μmを示す。

【図７】

図７は、in vivoでのIRBITのIP$_3$R1との会合を示す図である。マウス小脳粗ミクロソームの界面活性剤抽出液を抗IRBIT抗体またはコントロール抗体で免疫沈降した。沈降物をSDS-PAGE後、抗IP$_3$R1（上図）または抗IRBIT（下図）の各抗体でウ

ェスタンブロットした。

【図８】

図８は、生理的濃度のIP_3により、選択的にIP_3R1からIRBITが解離する事を示す図である。図８Ａは、マウス小脳から得た粗ミクロソームからの高塩抽出画分をGST-ELとインキュベートした。結合したタンパク質をグルタチオン-セファロースでプルダウンし、グルタチオン(Glu)(a)または0.1～10 μM IP_3(a)、IP_2(b)、IP_4(c)、IP_6(d)またはATP(e)で溶出した。抽出液中のIRBITを抗IRBIT抗体とAlexa 680コンジュゲート二次抗体で分析した(aの下のパネル、およびb～e)。グルタチオンおよび0.1～10 μM IP_3での溶出液中のGST-ELを抗GST抗体で分析した(aの上のパネル)。図８Ｂは、抗IRBIT抗体により検出されたIRBITのバンドに由来するシグナル強度を赤外イメージングシステムで定量した結果を示す。相対強度を溶出剤の濃度に対してプロットした。少なくとも３回の独立した実験の平均±標準偏差で示している。

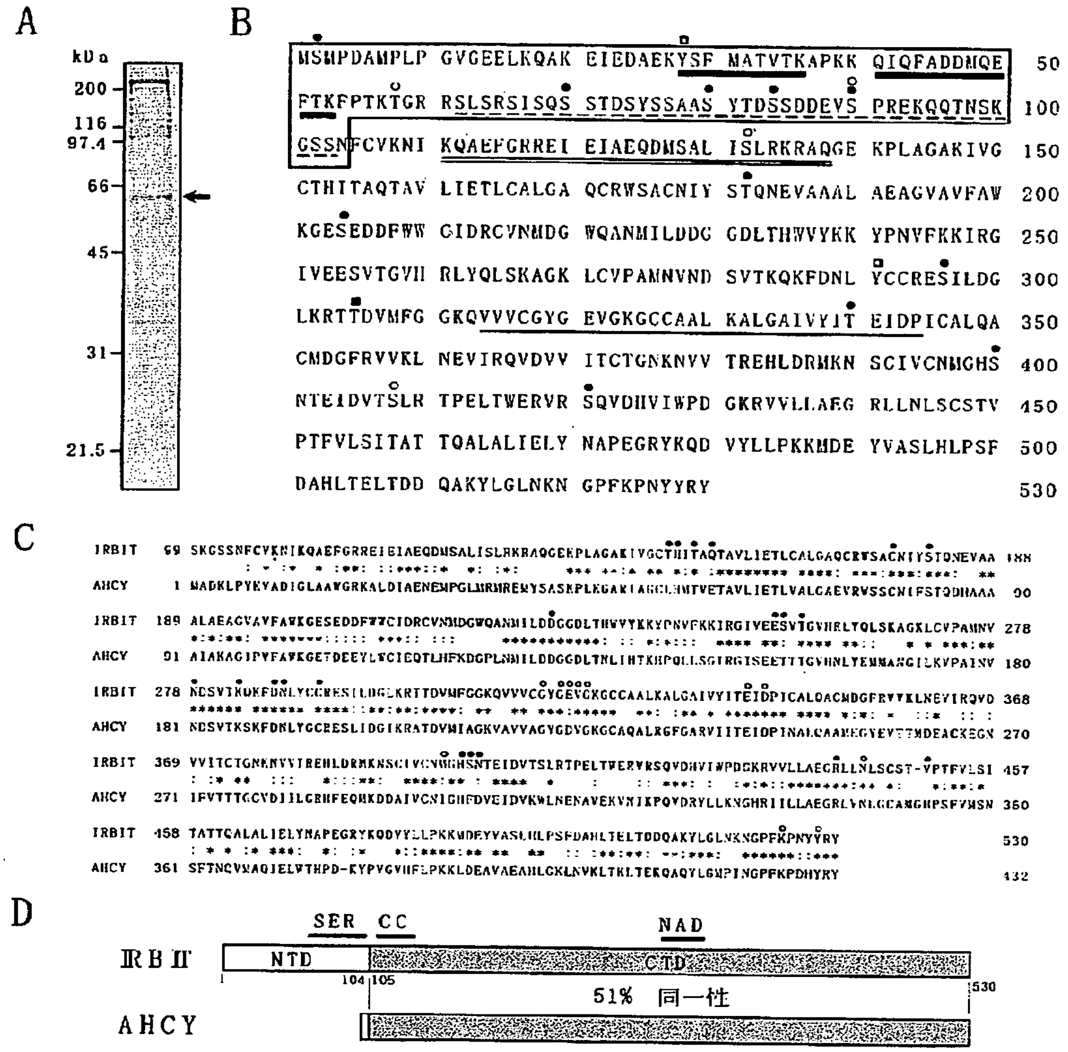
【図９】

図９は、IRBITがIP_3R1のIP_3結合領域と相互作用すること、およびこの相互作用にはIP_3R1の508番目のLysが必要であることを示す図である。図９Ａは、用いたマウスIP_3R1と組換えGST融合タンパク質の構造を模式的に図示している。IP_3結合コア領域は斜線部、推定膜貫通領域を黒塗りの線で示している。I～Vのローマ数字は、トリプシン限定分解により決定したIP_3R1のドメイン構造を示している(51)。各バーの上に付した数字は、アミノ酸残基の番号を示している。図９Ｂは、IP_3R1のIRBIT結合領域を調べた結果を示す。マウス小脳から得た粗ミクロソームからの高塩抽出画分を（Ａ）に示すGST融合タンパク質とインキュベートした。結合したタンパク質をグルタチオン-セファロースでプルダウンした後、グルタチオンで溶出して、抗IRBIT抗体を用いてウェスタンブロットにより分析した。図９Ｃは、（Ｂ）と同様に、高塩抽出画分をGST-IbIIa、R441QおよびK508Aでプルダウンアッセイした結果である。結合したタンパク質をグルタチオン-セファロースでプルダウンした後、グルタチオンで溶出して、抗IRBIT抗体を用いてウェスタンブロットにより分析した(上図)。グルタチオン-セファロースでプルダウンしたGST融合タンパク質を、クマシーブリリアントブルーで染色した(下図)

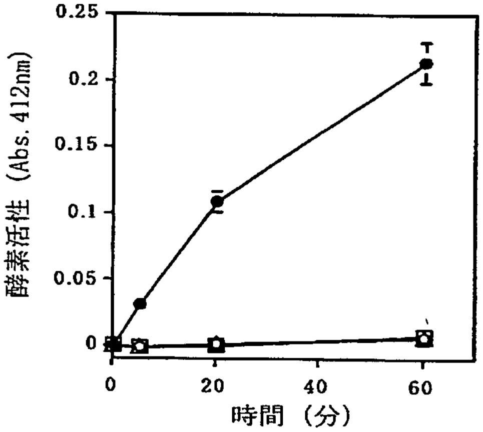
。

【書類名】　図面

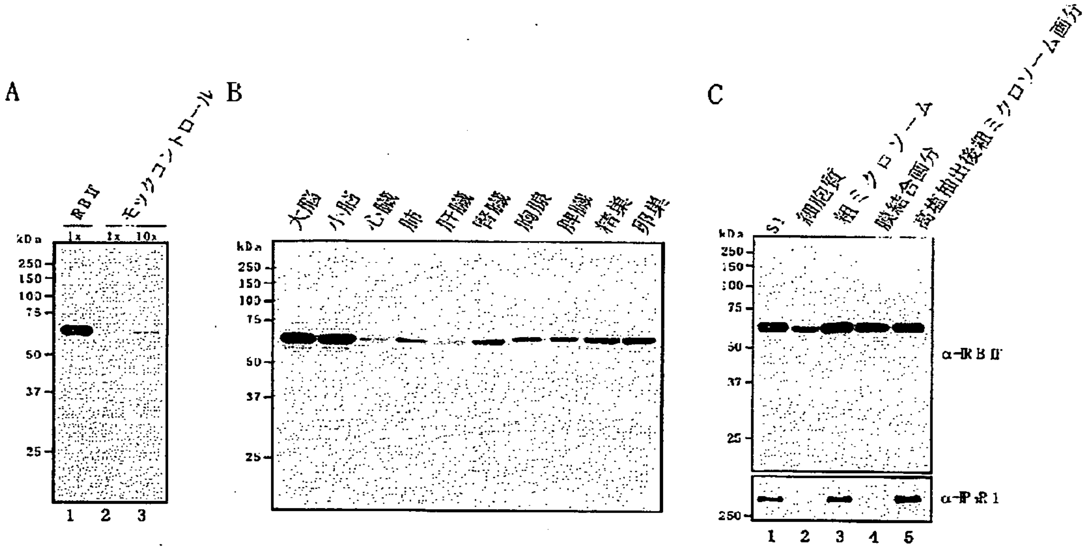
【図１】


A
kDa
200
116
97.4
66
45
31
21.5
B
MSMPDAMPLP GVGEELKQAK EIEDAEKYSF MATVTKAPKK QIQFADDMQE 50
FTKFPTKTGR RSLSRSISQS STDSYSSAAS YTDSSDDEVS PREKQQTNSK 100
GSSNFCVKNI KQAEFGRREI EIAEQDMSAL ISLRKRAQGE KPLAGAKIVG 150
CTHITAQTAV LIETLCALGA QCRWSACNIY STQNEVAAAL AEAGVAVFAW 200
KGESEDDFWW CIDRCVNMDG WQANMILDDG GDLTHWVYKK YPNVFKKIRG 250
IVEESVTGVH RLYQLSKAGK LCVPAMNVND SVTKQKFDNL YCCRESILDG 300
LKRTTDVMFG GKQVVVCGYG EVGKGCCAAL KALGAIVYIT EIDPICALQA 350
CMDGFRVVKL NEVIRQVDVV ITCTGNKNVV TREHLDRMKN SCIVCNMGHS 400
NTEIDVTSLR TPELTWERVR SQVDHVIWPD GKRVVLLAEG RLLNLSCSTV 450
PTFVLSITAT TQALALIELY NAPEGRYKQD VYLLPKKMDE YVASLHLPSF 500
DAHLTELTDD QAKYLGLNKN GPFKPNYYRY 530
C
IRBIT 99 … 188
AHCY 1 … 90
IRBIT 189 … 278
AHCY 91 … 180
IRBIT 278 … 368
AHCY 181 … 270
IRBIT 369 … 457
AHCY 271 … 360
IRBIT 458 … 530
AHCY 361 … 432
D
SER
CC
NAD
IRBIT
NTD
CTD
1
104
105
530
51%　同一性
AHCY

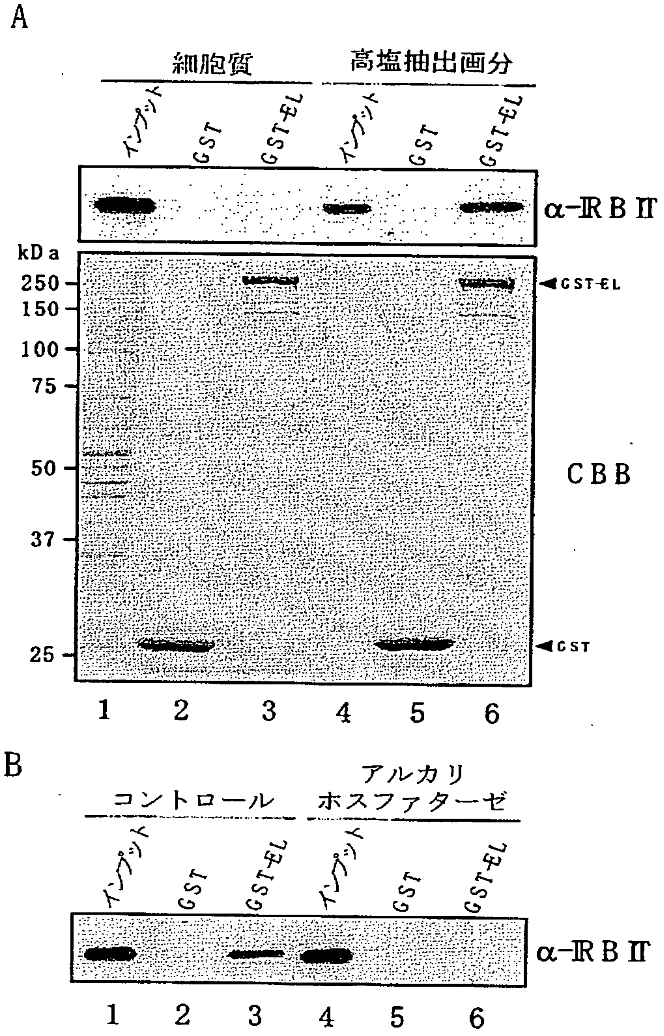
【図２】


0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
酵素活性（Abs. 412nm）
0
20
40
60
時間（分）

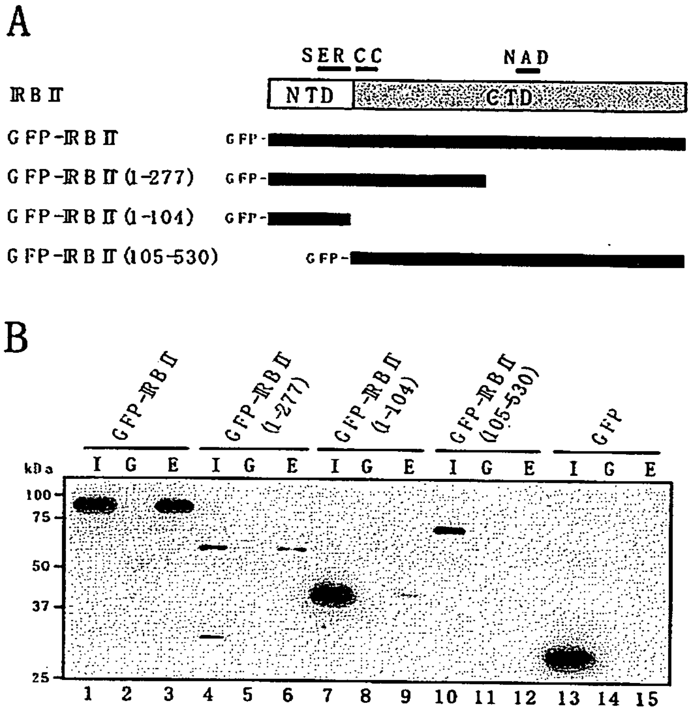
【図３】


A
IRBIT
モックコントロール
1x
1x
10x
kDa
250
150
100
75
50
37
25
1
2
3
B
大脳
小脳
心臓
肺
肝臓
腎臓
胸腺
脾臓
精巣
卵巣
kDa
250
150
100
75
50
37
25
C
S1
細胞質
粗ミクロソーム
膜結合画分
高塩抽出後粗ミクロソーム画分
kDa
250
150
100
75
50
37
25
250
α-IRBIT
α-IP3R1
1
2
3
4
5

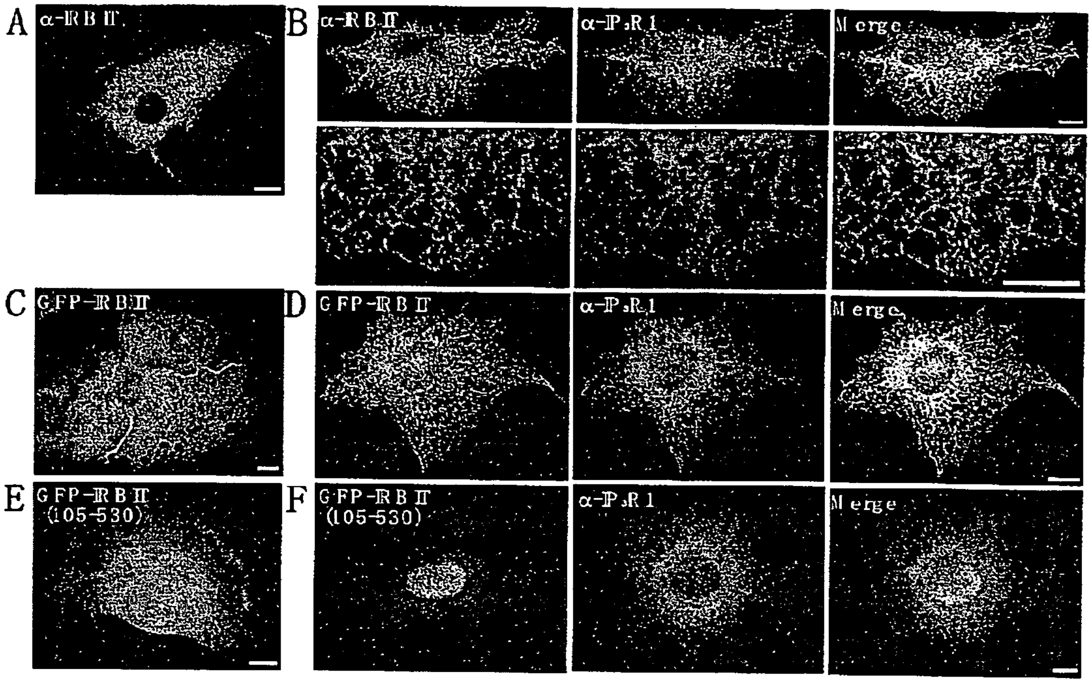
【図４】


A
細胞質
高塩抽出画分
インプット
GST
GST-EL
インプット
GST
GST-EL
α-IRBIT
kDa
250
150
100
75
50
37
25
GST-EL
GST
CBB
1
2
3
4
5
6
B
コントロール
アルカリ
ホスファターゼ
インプット
GST
GST-EL
インプット
GST
GST-EL
α-IRBIT
1
2
3
4
5
6

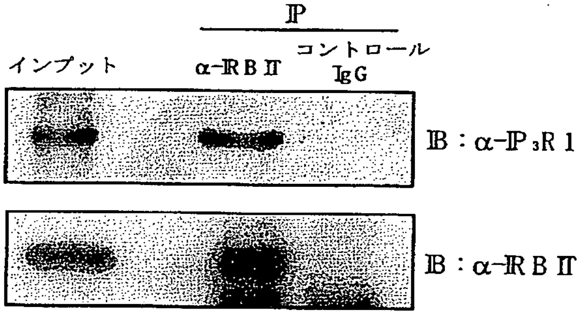
【図５】


A
SER
CC
NAD
IRBIT
NTD
CTD
GFP-IRBIT
GFP-IRBIT(1-277)
GFP-IRBIT(1-104)
GFP-IRBIT(105-530)
GFP-
B
GFP-IRBIT
GFP-IRBIT (1-277)
GFP-IRBIT (1-104)
GFP-IRBIT (105-530)
GFP
I G E
kDa
100
75
50
37
25
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

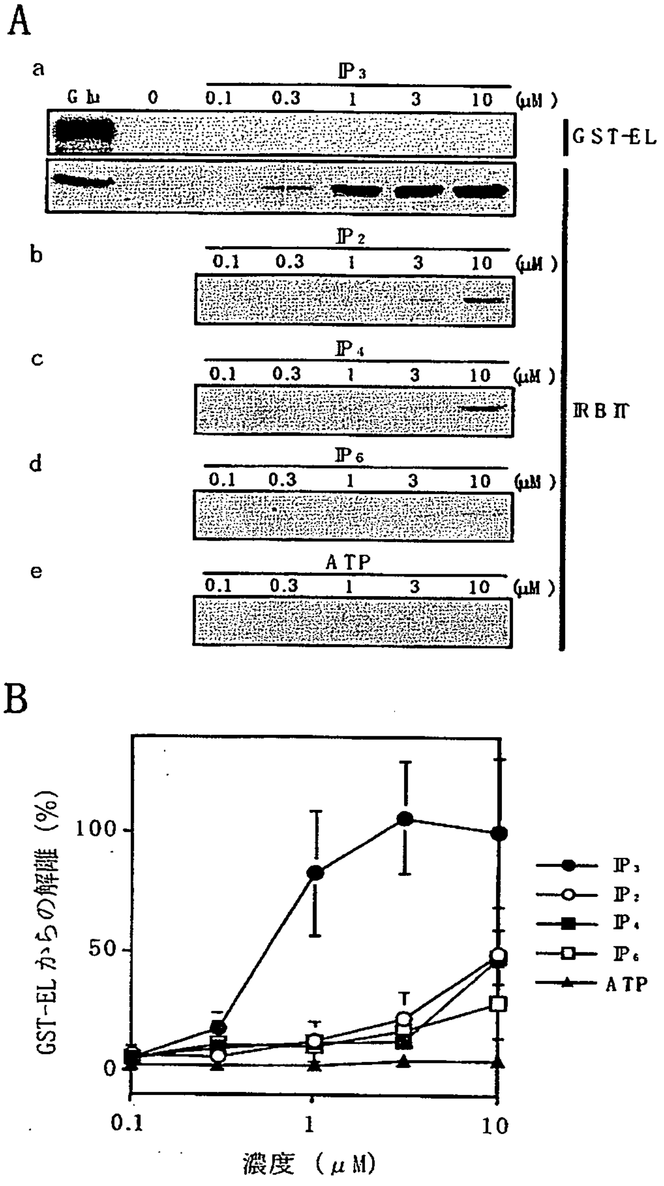
【図６】


A
α-IRBIT
B
α-IRBIT
α-IP3R1
Merge
C
GFP-IRBIT
D
GFP-IRBIT
α-IP3R1
Merge
E
GFP-IRBIT
(105-530)
F
GFP-IRBIT
(105-530)
α-IP3R1
Merge

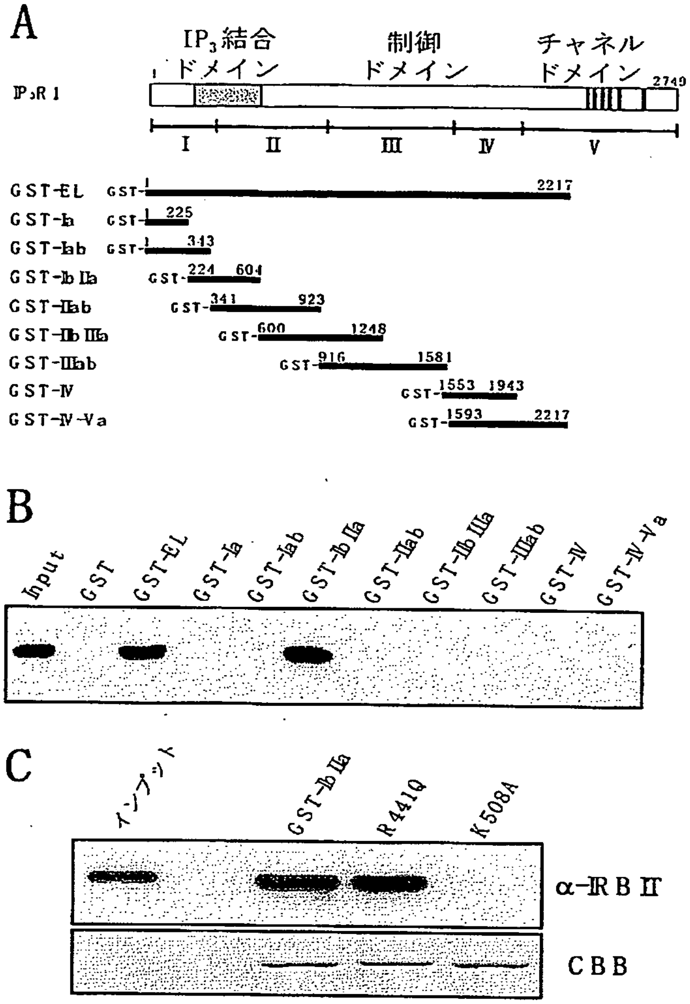
【図７】


IP
インプット
α-IRBIT
コントロール
IgG
IB：α-IP3R1
IB：α-IRBIT

【図８】


A
a
IP3
Glu
0
0.1
0.3
1
3
10
(μM)
GST-EL
b
IP2
c
IP4
d
IP6
e
ATP
IRBIT
B
GST-ELからの解離（%）
100
50
0
0.1
1
10
濃度（μM）
IP3
IP2
IP4
IP6
ATP

【図９】


A
IP₃結合ドメイン
制御ドメイン
チャネルドメイン
IP₃R1
1
2749
I
II
III
IV
V
GST-EL GST- 1 2217
GST-Ia GST- 1 225
GST-Iab GST- 1 343
GST-IbIIa GST- 224 604
GST-IIab GST- 341 923
GST-IIbIIIa GST- 600 1248
GST-IIIab GST- 916 1581
GST-IV GST- 1553 1943
GST-IV-Va GST- 1593 2217
B
Input
GST
GST-EL
GST-Ia
GST-Iab
GST-IbIIa
GST-IIab
GST-IIbIIIa
GST-IIIab
GST-IV
GST-IV-Va
C
インプット
GST-IbIIa
R441Q
K508A
α-IRBIT
CBB

【書類名】　要約書

【要約】

【課題】　本発明は、IP_3の検出および定量に有効な指示薬となる新規IP_3受容体結合タンパク質を提供し、ならびにそれを用いたIP_3の検出および/または定量方法を提供する。

【解決手段】　IP_3受容体結合タンパク質、特にIP_3受容体と相互作用し、かつ該相互作用がIP_3により制御される、新規IP_3受容体結合タンパク質IRBITを同定した。IRBITは生理的濃度のIP_3によりIP_3受容体から解離可能であるという特性を有する。該特性により、IRBITはFRET法等によりIP_3を検出するために指示薬として有用である。

【選択図】　なし

出願人履歴情報

識別番号　［０００００６７９２］

１．変更年月日　１９９０年　８月２８日
　［変更理由］　新規登録
　住　所　埼玉県和光市広沢２番１号
　氏　名　理化学研究所